

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra genetiky a šlechtění**



**Molekulární markery a jejich využití ve šlechtění odrůd  
jabloní**

**Bakalářská práce**

**Tomáš Gottfried  
Rostlinná produkce**

**Vedoucí práce doc. Dr. Ing. Pavel Vejl**

© 2020 ČZU v Praze

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Molekulární markery a jejich využití ve šlechtění odrůd jabloní" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne datum odevzdání

\_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi za odborné vedení této práce, poskytnuté materiály a rady, které jsem bezzbytku využil.

# Molekulární markery a jejich využití ve šlechtění odrůd jableň

## Souhrn

Současný rychlý vývoj technologií ovlivnil i oblast molekulární genetiky. Genetickou informaci je možné číst nebo měnit s přesností na jednotlivé báze. Vznikají nové metody, které zrychlují a zjednodušují detekci polymorfismů DNA nebo RNA. Použití molekulárních markerů se stalo výrazně dostupnějším a levnějším nástrojem, který nachází stále širší uplatnění v zemědělství i dalších oborech. České zemědělství v současné době prochází problematičným obdobím. Mezi nejvážnější faktory patří rychlé změny klimatu, snížená obranyschopnost ekosystémů, příchod nových škůdců a chorob spojený s regulací používání pesticidů, silná levná konkurence ze zemí jako je Čína, nebo nízké výkupní ceny komodit. Na dnešního českého zemědělce je vyvíjen silný tlak, který ho nutí ke změně způsobu hospodaření a mnohem vyšší efektivitě. Efektivnější a ekologičtější zemědělství předpokládá použití nových odrůd plodin odolných vůči suchu nebo běžným chorobám a škůdcům, odrůd schopných rychlého nástupu do plodnosti a poskytujících vysoké výnosy. Poptávka po nových odrůdách plodin žene šlechtitelské ústavy do závodu o vyšlechtění žádané odrůdy v co nejkratším čase. Zde může být použití molekulárních markerů výrazným přínosem.

Molekulární markery jsou krátké úseky DNA. Jejich alely jsou v genové vazbě s funkčním genem ovlivňujícím nebo přímo zodpovědným za významnou cílovou vlastnost organismu. Nejčastějšími aplikacemi molekulárních markerů jsou detekce vlastností a odlišení jedinců v rané fázi ontogenetického vývoje, určování odrůdové pravosti, tvorba fylogenetických map a zkoumání příbuzenských vzdáleností.

Tato bakalářská práce shrnuje využití molekulárních markerů ve šlechtění jableň. Zaměřuje se na markery využívané v procesu asistované selekce pomocí markerů, popisuje jednotlivé technologie a typy markerů. Hospodářsky významnými vlastnostmi jableň uvedené v této práci jsou: rezistence vůči padlí a strupovitosti, barva slupky a dužniny, faktory ovlivňující délku skladování, přítomnost alergenů, sloupcový růst a kompatibilitu opylení. Závěr je věnován praktickému využití MAS (Marker Assisted Selection) v největších šlechtitelských ústavech v Čechách i zahraničí.

**Klíčová slova:** jableň, *Malus*, šlechtění, markery, MAS

# Molecular markers and their use in breeding apple varieties

## Summary

The current rapid development of technology has also affected the field of molecular genetics. Genetic information can be read or changed with precision on individual basis. New methods that speed up and simplify the detection of DNA or RNA polymorphisms are emerging. The use of molecular markers has become a significantly more affordable and cheaper tool, which is increasingly used in agriculture and other fields. Czech agriculture is currently going through a problematic period. The most serious factors include rapid climate change, reduced immunity of ecosystems, the appearance of new pests and diseases associated with the regulation of pesticide use, strong cheap competition from countries such as China or low purchase prices for commodities. Today's Czech farmer is under strong pressure, which forces him to change the way of farming and much higher efficiency. More efficient and greener agriculture supposes the use of new crop varieties resistant to drought or common diseases and pests, varieties capable of rapid onset of fertility and providing high yields. Demand for new varieties of crops drives breeding institutes to race to breed the desired variety in the shortest possible time. Here, the use of molecular markers can be a significant benefit.

Molecular markers are short strings of DNA. Their alleles are in gene linkage with a functional gene affecting or directly responsible for an important target property of the organism. The most common applications of molecular markers are the detection of characteristics and differentiation of individuals in the early phase of ontogenesis, the determination of varietal authenticity, the creation of phylogenetic maps and the study of kinship distances.

This bachelor thesis summarizes the use of molecular markers in apple breeding. It focuses on markers used in the process of assisted selection using markers, describes the various technologies and types of markers. Economically important properties of apple trees mentioned in this work are: resistance to mildew and scab, colour of skin and flesh, factors influencing the length of storage, the presence of allergens, column growth and compatibility of pollination. The conclusion is devoted to the practical use of MAS (Marker Assisted Selection) in the largest breeding institutes in the Czech Republic and abroad.

**Keywords:** Apple, *Malus*, breeding, markers, MAS

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Cíl práce.....</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1</b>	<b>Jabloň – (<i>Malus × domestica</i>) .....</b>	<b>10</b>
3.1.1	Taxonomické zařazení jabloní.....	10
3.1.2	Původ a historie .....	10
3.1.3	Šlechtění jabloní.....	11
3.1.4	Metody šlechtitelské práce.....	13
<b>3.2</b>	<b>MAS – (Marker Assisted Selection) .....</b>	<b>14</b>
3.2.1	Co jsou markery .....	14
3.2.2	Markery založené na restriční analýze .....	15
3.2.3	Markery založené na amplifikaci DNA.....	16
3.2.4	Využití mikrosatelitních markerů.....	17
3.2.5	Co jsou mikrosatelity .....	18
<b>3.3</b>	<b>PCR.....</b>	<b>19</b>
3.3.1	Základní kroky PCR.....	20
3.3.2	Elektroforetická separace .....	22
<b>3.4</b>	<b>Rezistenční šlechtění.....</b>	<b>23</b>
3.4.1	Co je rezistence.....	23
3.4.2	Genetické markery v rezistenčním šlechtění.....	25
3.4.3	Strupovitost jabloní ( <i>Venturia inaequalis</i> ).....	25
3.4.4	Padlí jabloňové ( <i>Podosphaera leucotricha</i> ).....	31
<b>3.5</b>	<b>Šlechtění na jakostní znaky plodů.....</b>	<b>34</b>
3.5.1	Barva slupky .....	34
3.5.2	Barva dužniny .....	36
<b>3.6</b>	<b>Skladování .....</b>	<b>37</b>
3.6.1	Etylen .....	37
3.6.2	Molekulární markery genů <i>Md-ACO1</i> a <i>Md-ACS1</i> ovlivňujících měknutí plodů jabloní 38	
<b>3.7</b>	<b>Alergeny .....</b>	<b>39</b>
<b>3.8</b>	<b>Šlechtění na odlišné růstové typy .....</b>	<b>41</b>
<b>3.9</b>	<b>Hodnocení opylovacích poměrů .....</b>	<b>42</b>
<b>3.10</b>	<b>Využití MAS v ČR a ve světě.....</b>	<b>44</b>
3.10.1	Insitut für Züchtungsforschung an Obst des JKI (Julius Kühn-Insitut), Dresden-Pillnitz 44	
3.10.2	INRA .....	46
3.10.3	Ústav experimentální botaniky AV ČR .....	46

3.10.4	Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy .....	47
<b>4</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>48</b>
<b>5</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů.....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>Seznam tabulek.....</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>Seznam obrázků.....</b>	<b>54</b>

# 1 Úvod

Jabloň (*Malus Mill.*) je hlavním ovocným druhem pěstovaným v mírném podnebném pásu. Ve světovém měřítku jsou jablka spolu s citrusy a banány považovány za nejpěstovanější ovoce světa.

Roční světová produkce jablek činila v sezóně 2016/17 přes 76,731 milionů tun, v sezóně 2017/18 pak 74,350 miliony tun. Mezi nejvýznamnější světové producenty jablek patří Čína (56%), Evropská Unie (13%), USA (7%), Turecko (4%), Irán (4%) (USDA 2019).

Nejvýznamnější producenti jablek v rámci EU jsou Polsko se čtyřmi miliony tun, Itálie s 2,2 miliony tun, Francie s 1,5 milionem tun a Německo s jedním milionem tun. Česká republika vyprodukovala v r. 2015 156 tisíc tun jablek, v r. 2017 102 tisíce tun. V posledních letech se trvale zvyšuje poptávka po jablkách v bio kvalitě. Roční produkce bio jablek v EU činí okolo 380 tisíc tun, t.j. 3,5% (Binard 2018). Mezi nejvíce pěstované odrůdy v České republice patří Golden Delicious, Idared, Spartan (Buchtová 2018).

Dnešní spotřebitel klade důraz na kvalitu plodů. Důležité jsou chuť, barva, vůně, velikost a tvar, nebo délka skladování. Pěstitelé jablek se stále více potýkají s nepříznivými faktory, které způsobují výkyvy v produkci. Jedná se o změny klimatických podmínek, rozšiřování nových patotypů škodlivých organismů a s tím spojenou ztrátu rezistence, rozšiřování dalších druhů chorob a škůdců, nebo o důsledky mezinárodní politiky jako je Brexit, nebo americko-čínská obchodní válka.

Aby zůstalo české ovocnářství i nadále konkurenceschopné, bude muset produkovat ovoce vysoké kvality a zohlednit měnící se tržní i klimatické podmínky při šlechtění nových odrůd. K tomu mohou přispět i technologie genového inženýrství. Vejl et al. (2005) uvádí, že přínosné jsou zvláště techniky markerování významných genů. Jejich výhodou je možnost rychlé selekce semenáčků (MAS – Marker Assisted Selection), přičemž není nutné čekat na jejich nástup do plodnosti. Díky tomu se celý proces tvorby odrůdy může dramaticky zrychlit a tím i zlevnit.



## 2 Cíl práce

Řešení bakalářské práce je postaveno na následujících vědeckých hypotézách:

1. U jabloní existují geny podléhající monogenní dědičnosti, jejichž alely souvisejí s některými šlechtitelsky důležitými vlastnostmi.
2. Rozdíly mezi alelami jsou způsobeny substitučními nebo inzerčně delečními mutacemi.
3. Současné nástroje molekulární genetiky umožňují tyto mutace jednoznačně detekovat a jsou základem molekulárních markerů aplikovaných šlechtění.

Cílem práce je vypracování ucelené literární rešerše zaměřené na aplikaci markerů ve šlechtění jabloní, a to konkrétně v následujících oblastech:

1. Rezistentní šlechtění,
2. Šlechtění na odlišné růstové typy,
3. Šlechtění na jakostní znaky plodů,
4. Hodnocení opylovacích poměrů.

### 3 Literární rešerše

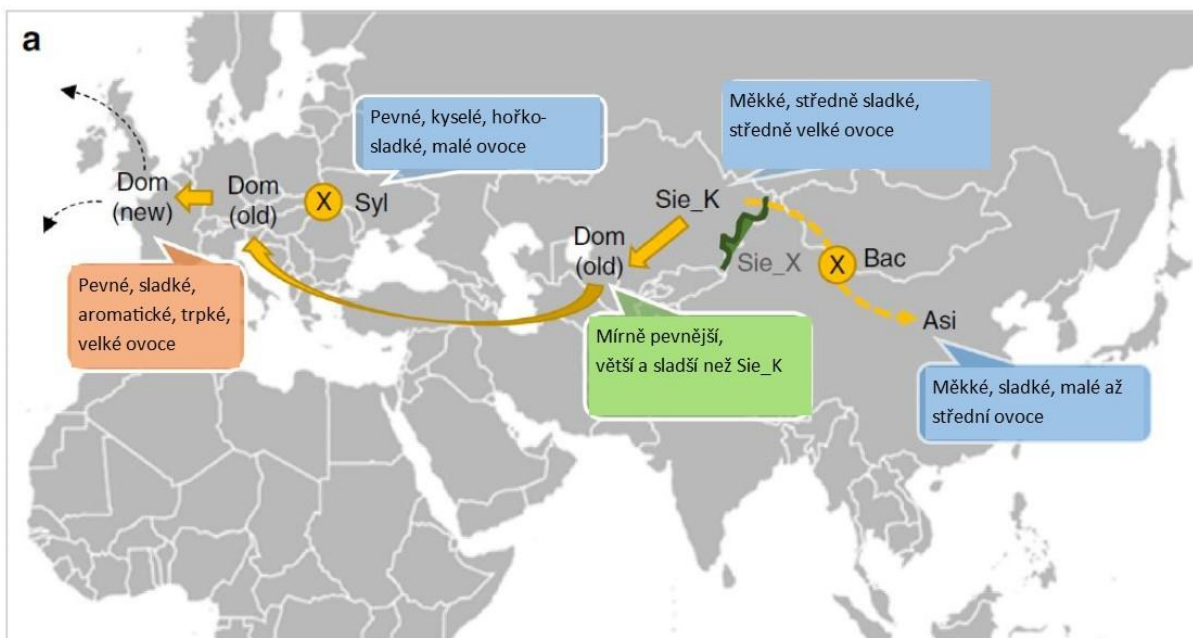
#### 3.1 Jabloň – (*Malus × domestica*)

##### 3.1.1 Taxonomické zařazení jabloní

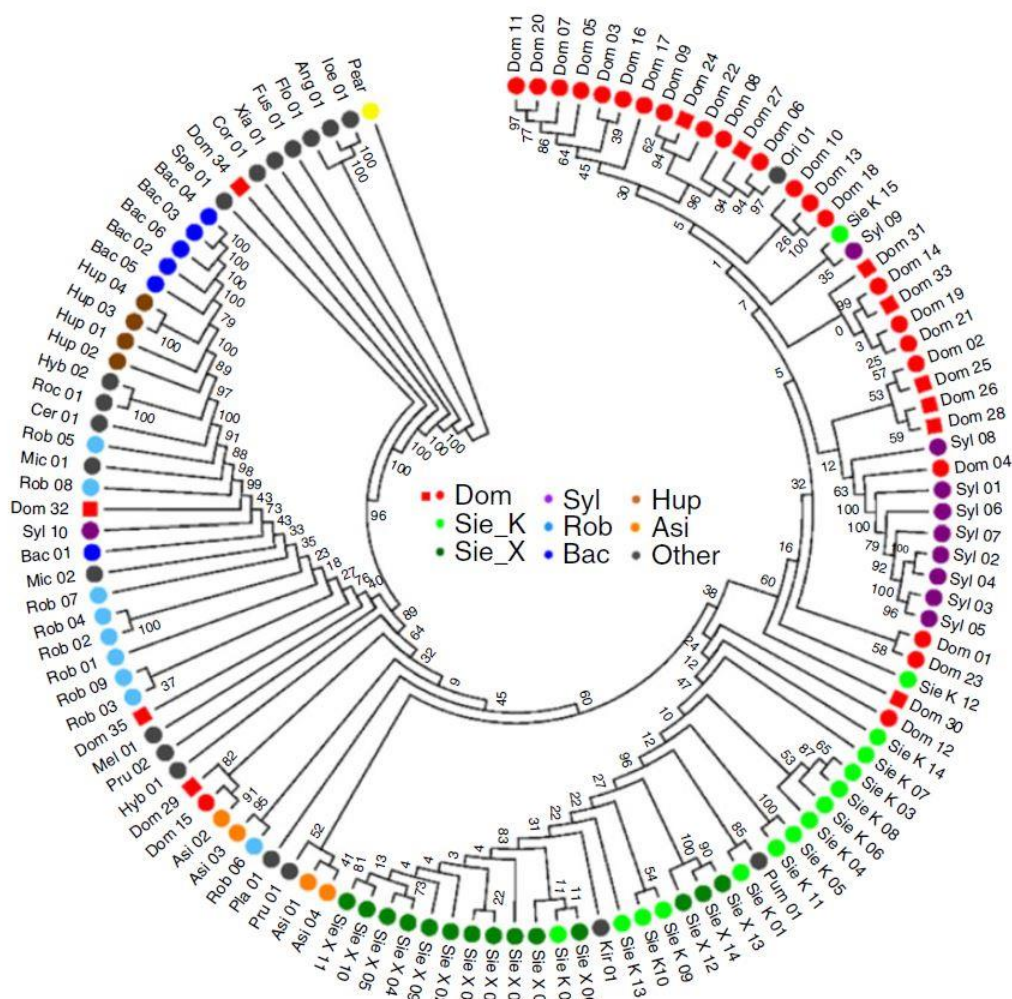
Botanicky je rod Jabloň (*Malus* Mill.) zařazen do řádu růžotvarých (*Rosales*), čeledě růžovitých (*Rosaceae*) a podčeledě jabloňovitých (*Maloideae*). Rod zahrnuje mezi 11–36 druhů, které se přirozeně vyskytují v mírném podnebném pásu severní polokoule. Tyto rozdíly v počtu druhů jsou způsobeny zejména častou tvorbou mezidruhových hybridů, které někteří autoři považují za samostatné druhy. Všechny pěstované odrůdy jabloní se zařazují do hybridního druhu označeného *Malus × domestica* Borkh. Další významné druhy jsou *M. pumila* Mill., do něhož patří většina typových podnoží, *M. floribunda* Sieb., která je donorem genu rezistence proti strupovitosti, a *M. prunifolia* Borkh., využívaná ve šlechtění mrazuvzdorných odrůd (Vejl et al. 2005). Z praktického hlediska a pomologického třídění ovocných druhů, zařazujeme jabloň do skupiny jádrového ovoce. (Dvořák 1987)

##### 3.1.2 Původ a historie

Kulturní jabloně pravděpodobně pocházejí z *Malus sieversii*, původem z Kazachstánu a jejího křížení s *Malus sylvestris*. Duan et al. (2017) zmapoval genetickou variabilitu a postupnou domestikaci jabloní podél Hedvábné stezky. Výsledkem je mapa rozšíření jabloní z místa původu (obr. 1) a fylogenetický strom popisující vzájemné vztahy jednotlivých druhů a jejich hybridů (obr. č. 2). Duan et al. (2017) sledoval hlavní geny zodpovědné za velikost plodu, strukturu a chuť. Na obrázku číslo 1 je vidět i vývoj těchto vlastností napříč kontinenty.



Obrázek 1: Evoluční mapa jabloní, upraveno podle (Duan et al. 2017)



Obrázek 2: Fylogenetický strom jabloní (Duan et al. 2017)

Vejl et al. (2005) uvádí, že kulturní formy jabloní se ve střední Evropě pěstovaly již ve 2. tisíciletí před naším letopočtem. Nové odrůdy z počátku vznikaly náhodným sprášením a výběrem stromků s vhodnými vlastnostmi. Cílené šlechtění nových odrůd však vzniklo až ve starověkém Řecku a Římě s rozvojem roubování. Zde pravděpodobně také došlo k první rozsáhlejší samovolné hybridizaci. V zaalpských zemích se jablka začala pěstovat až po římské invazi. V 9. století začali pěstovat jabloně také Slované na území současné ČR.

### 3.1.3 Šlechtění jabloní

Cummins & Aldwinckle (1983) popisují, že starověké umění roubování umožnilo spojení dvou nebo více genetických entit a využití jejich silných vlastností. Rouby produkovaly velké a kvalitní ovoce, podnož se starala o zásobení živinami a odolnosti k vnějším vlivům. Asi před 250 lety pěstitelé rozpoznali, že výběr správné podnože má významný vliv na charakteristiku produkce výsledného roubovaného kultivaru i to, že jeho charakteristiky jsou lepší než už neroubovaných jedinců.

Odrůdy vznikaly až do 18. století jednoduchým výběrem jedinců s nejlepšími vlastnostmi. Vznikaly nahodile nebo z volného sprášení, protože v této době nebyl znám význam pylu pro rozmnožování rostlin. Nové odrůdy se tak objevovaly v soukromých zahradách, sadech, nebo ve stromořadích podél cest. Pouze několik nadšenců, jako třeba Diel v Německu, nebo Knight v Anglii

začali počátkem devatenáctého století s hybridizačními pokusy (*Malus domestica* Borkh. = *M. Pumila* Mill.). Ale až poznání struktury buňky a znovuobjevení Mendelových zákonů dalo základ metodickému šlechtění (Dvořák 1987).

Jabloně jsou vysoce cizosprašné, často se u nich setkáváme i s inkompatibilitou. Přibližně 80% odrůd je diploidních (n=17), ostatní jsou triploidní (např. Boskoopské) nebo tetraploidní. Jabloně se množí vegetativně, odrůdy lze charakterizovat jako klony. Genotypy se udržují roubováním a očkováním na vhodné podnože. Nejrozšířenější metodou zvyšování variability je kombinační křížení. Využívá se rovněž spontánní nebo cílená mutagenese a explantátové šlechtění. Vzhledem k vysoké heterozygotnosti odrůd jsou potomstva kombinačního křížení obvykle vysoce variabilní. Pro vznik odrůdy je používána klonová selekce, případně speciální výběrové systémy u mutačního šlechtění (Vejl et al. 2005).

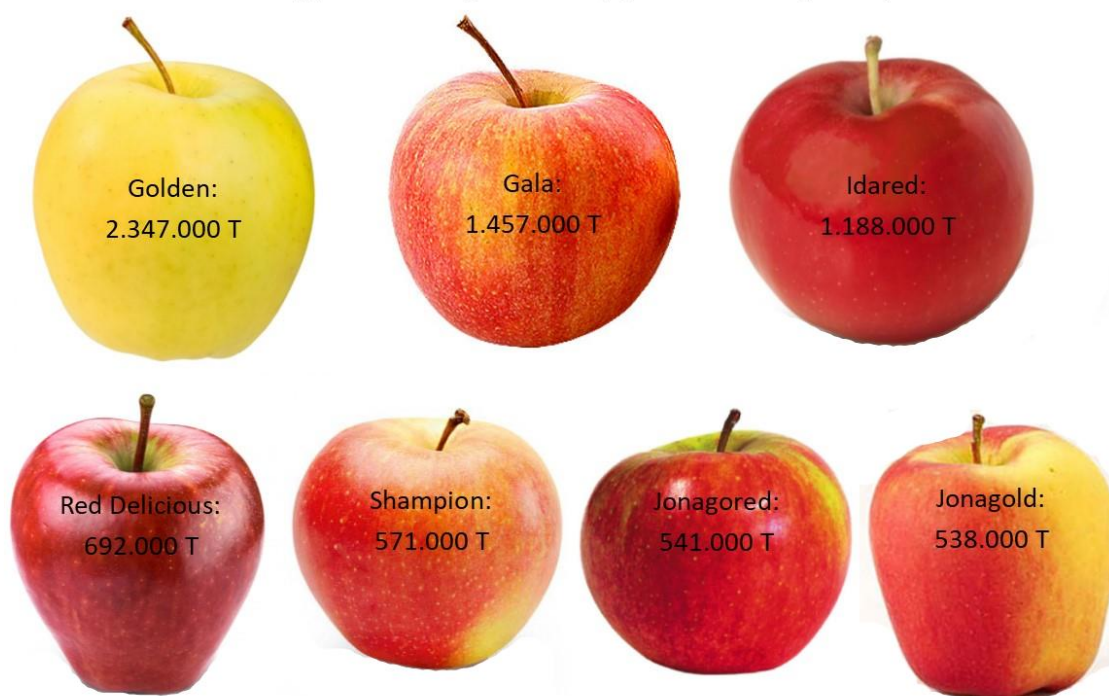
Jabloně nejsou příliš ideálním modelem pro genetický výzkum, a tudíž ani pro jeho aplikaci ve šlechtění, neboť mají dlouhý mezigenerační interval. Navíc jsou klony odrůd štěpovány a očkovány na podnože, čímž získávají rozdílné růstové vlastnosti oproti semenáčkům (Rod 1982).

Cíle šlechtění jabloní Rod (1982) dělí podle zaměření na:

- Odolnost proti mrazu, chorobám a škůdcům
- Vyhovující tvar koruny, přiměřeně silný stejnoměrný růst
- Včasnou a bohatou plodnost
- Menší náročnost na podmínky prostředí
- Pevnost držení plodů na větvi
- Uspokojivou velikost a tvar plodů
- Velmi dobrou jakost dužiny
- Atraktivní zbarvení slupky a dužiny
- Vhodnou dobu sklizňové a konzumní zralosti
- Trvanlivost plodů, uchovatelnost a odolnost proti otlakům
- Příznivý hmotnostní poměr užitečných částí plodů k částem odpadovým
- Odrůdy vhodné pro velkovýrobní technologii pěstování, mechanizovanou kultivaci i sklizeň

Vávra (2015) považuje za nejdůležitější šlechtitelské cíle vysokou kvalitu plodů, dobré pěstitelské vlastnosti a trvalou rezistenci vůči chorobám, jako například strupovitosti jabloní (*Venturia inaequalis*), padlí jabloňovému (*Podosphaera leucotricha*), nebo spále růžovitých (*Erwinia amylovora*).

### Nejpěstovanější odrůdy jablek v EU (2018)



Obrázek 3: Nejpěstovanější odrůdy jablek v EU. Upraveno podle (Binard 2018)

#### 3.1.4 Metody šlechtitelské práce

Podle Blažka (2001) je při šlechtění jabloní nutné volit jiné šlechtitelské metody než u ostatních kulturních plodin, protože jabloně jsou množeny vegetativně. V procesu šlechtění nových odrůd se využívá následujících technik:

- **Selekce semenáčů z volného sprášení.** Metoda spočívá ve výsevu semen z volného křížení, kdy není známa otcovská rostlina. Tato metoda se využívá především tam, kde se hledaný znak štěpí jen v malém procentu a není technicky možné pracovat s velkým množstvím rostlin.
- **Selekce semenáčů ze záměrného křížení.** Metoda je založena na hybridizaci dvou cíleně vybraných odrůd (mateřské a otcovské). Tímto způsobem je možné kombinovat vlastnosti potomstva. V praxi je nutné pracovat s dostatečně rozsáhlým souborem semenáčů, který je dále selektován. Hybridizace se také využívá k získání výhodných vlastností, které kulturním odrůdám jabloní chybějí. Jedná se o křížení s jinými druhy jabloní, u kterých se například vyskytují rezistence vůči chorobám, nebo mrazuvzdornost.
- **Selekce genových mutací přirozených a indukovaných.** Mutace označuje změnu v sekvenci DNA přenesenou na potomstvo. Podle úrovně, na které mutace působí, rozlišujeme mutace genové, chromozomové, nebo genomové. Výsledkem je určitý fenotypový, nebo fyziologický projev na daném jedinci. Tímto způsobem vzniklo mnoho důležitých odrůd jabloní (Blažek 2001).
- **Selekce s využitím technik transgenóze.** Metoda nepřímé transgenóze je založena na vnášení genů pomocí bakterií *Agrobacterium tumefaciens* a *Agrobacterium rhizogenes*. Jedná se o gram-negativní, půdní bakterie napadající narušená pletiva dvouděložných rostlin, kde jsou schopny vnášet části své genetické výbavy. Při přímé transgenózi je využíváno působení DNA na rostlinné tkáně, buňky nebo protoplasty. V dnešní době se

nejvíce používá tradiční transformace protoplastu polyetylglykolem, elektroporace a také biobalistika (Hruban 1999)

### 3.2 MAS – (Marker Assisted Selection)

Vyšlechtění nové odrůdy však představuje zdlouhavý a náročný proces. Kombinací klasického šlechtění a poznatků z rostlinné genomiky můžeme dosáhnout značného zjednodušení tohoto procesu. Vávra et al. (2015) uvádí, že zavedení MAS (Marker Assisted Selection) do selekce jabloňových semenáčků umožňuje identifikaci těch, které nesou alely pro požadovaný fenotypový projev. K identifikaci jsou využívány mikrosatelitní markery, které jsou v těsné vazbě s těmito znaky. Selekcí pomocí molekulárních markerů je možné vybírat hybridní semenáče z provedeného řízeného křížení již v prvním roce vegetace. To může podstatně urychlit šlechtitelský proces, snížit náklady selekce a snižovat potřebu na chemické přípravky v integrované produkci. Z těchto důvodů se MAS stala velmi významným nástrojem šlechtitelů na celém světě.

#### 3.2.1 Co jsou markery

Tanksley (1983) charakterizuje DNA markery následovně:

- Jsou aplikovatelné u všech organismů, kde je zvládnutá technika izolace DNA
- Nejsou závislé na podmínkách prostředí
- Jejich počet je téměř neomezený
- DNA markery lze aplikovat i při minimálním množství biologického materiálu, jsou nedestruktivní
- Pomocí DNA markerů lze charakterizovat i velmi raná ontogenetická stadia rostlin.

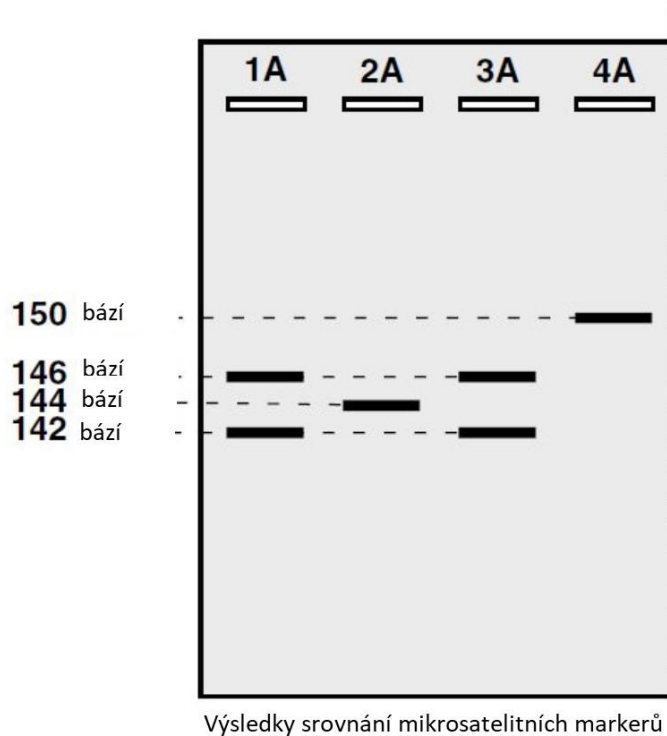
Genetické markery definuje Vejl (1997) jako jednoznačně a rychle detekovatelné vlastnosti organismů, které jsou v těsné korelaci s často komplexními hospodářsky významnými vlastnostmi (např. kvalita, odolnost). Genetické markery mohou být založeny na morfologicko-anatomických vlastnostech, nebo na biochemických vlastnostech organismů. Nejčastěji jsou používány biochemické markery, které vycházejí z polymorfismu zásobních proteinů, izoenzymů nebo nukleových kyselin. Pokrok v oblasti biochemie a molekulární biologie umožnil aplikace dalších typů biochemicko-genetických markerů – markery založené na polymorfismu DNA. Společným znakem DNA markerů je přímá schopnost detekce alelických variant v sekvenci nukleotidů.

Rozdíly v počtu opakování motivu mikrosatelitů určují jednotlivé alely. Kodominantní markery umožňují identifikovat všechny alely přítomné na daném lokusu, zatímco dominantní markery odhalí pouze jednu dominantní alelu. Proto jsou kodominantní markery obecně přesnější, dominantní markery lze ovšem často vyvinout snáze.

U diploidních druhů každý kodominantní marker identifikuje jednu alelu v případě homozygota a dvě alely u heterozygota. Schopnost rozlišit heterozygoty a homozygoty je jednou z nejdůležitějších vlastností kodominantních markerů, protože umožňuje lehce vypočítat frekvence jednotlivých alel v populaci. Dominantní markery identifikují v každém lokusu jen jednu alelu. Jejich využití neumožňuje rozpoznat heterozygoty od homozygotů, proto je obtížné vypočítat frekvence jednotlivých alel v populaci. Typicky se využívají náhodné primery k amplifikaci anonymních úseků DNA, přičemž jeden marker generuje data z několika lokusů naráz. Jejich výhoda spočívá v tom, že není třeba předem znát žádné sekvence a jejich využití je méně náročné a nákladné než u kodominantních markerů (Freeland et al. 2011).

Homozygotní mikrosatelitový lokus má stejný počet opakování jednotek daného mikrosatelitu na obou homologních chromozomech, zatímco heterozygot má odlišný počet opakování pro každou alelu (Oliveira et al. 2006). Elektroforetická analýza kodominantního

mikrosatelitního markeru je ukázána na následujícím obrázku. Jedinci 1A a 3A jsou heterozygotní, 2A a 4A jsou homozygotní.



Obrázek 4: Elektroforéza mikrosatelitů. Upraveno podle (Freeland 2005)

Podle využívaných technologií můžeme molekulární markery rozdělit na markery založené na využití restrikčních enzymů štěpících DNA na fragmenty a na ty založené na amplifikaci úseků DNA pomocí PCR (polymerázové řetězové reakce).

### 3.2.2 Markery založené na restrikční analýze

**RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism), Polymorfismus délky restrikčních fragmentů. Freeland at al. (2011) uvádí, že restrikční analýza DNA využívá tzv. restrikčních enzymů, proteinů rozpoznávajících určité, předem dané motivy (restrikční místa) v sekvenci DNA. Tato restrikční místa jsou tvořena úseky DNA o délce 4–6 párů bází. Enzym molekulu v těchto místech rozštěpí. Výsledkem je molekula DNA rozdělená do fragmentů odpovídajících vzdáleností mezi jednotlivými restrikčními místy. Pokud mají dva jedinci restrikční místa různě daleko od sebe, výsledné fragmenty DNA budou mít různou délku. Zjišťuje se tedy délkový polymorfismus vzniklých fragmentů. Restrikce pracuje s neznámými, náhodně generovanými restrikčními sekvencemi. Princip metody RFLP je uveden na následujícím obrázku.





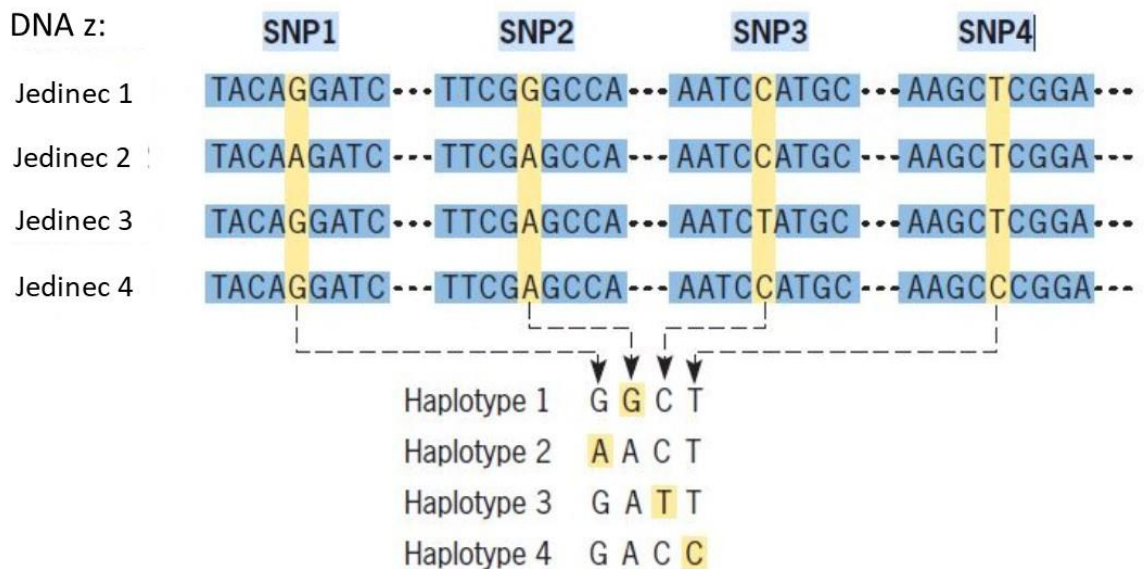
(obvykle 10 párů bází). Sleduje se délkový polymorfismus. Výsledky jsou nicméně komplikovaně reprodukovatelné a technika je postupně nahrazována kodominantními markery.

**AFLP** (Amplified Fragment Length Polymorphism), délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů kombinuje použití restričních enzymů a PCR. Enzymy rozdělí DNA na fragmenty, z nichž se amplifikují pouze ty, které mají na konci shodnou sekvenci. AFLP využívá náhodné úseky DNA, ale je spolehlivější než RAPD.

**PCR-RFLP** kombinuje PCR s restričními enzymy. Specifický úsek DNA se nejprve amplifikuje pomocí PCR a následně štěpí restričními enzymy. Jedná se o kodominantní marker.

**SNP** (Single Nucleotide Polymorphism), polymorfismus jednoho nukleotidu je marker tvořený variantami páru bází na určité lokaci, kde dochází k substituci báze. Narozdíl od předchozích markerů, u SNP se nejedná o délkový polymorfismus, ale pomocí sekvenování produktů předchozí PCR se zjišťuje konkrétní báze.

Následující obrázek prezentuje použití SNP markeru a ukazuje variabilitu 4 cílových míst u 4 různých jedinců.



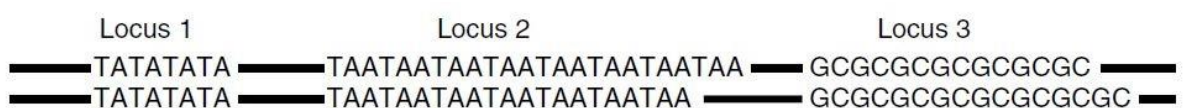
Obrázek 7: Single Nucleotide Polymorphism. Upraveno podle (Snustad & Simmons 2012)

### 3.2.4 Využití mikrosatelitních markerů

Podle Oliveiry et al. (2006) jsou mikrosatelity, nebo SSRs (Simple Sequence Repeats), nejrozšířenějšími molekulárními markery se širokým spektrem využití. Tento rozsah aplikací je způsoben skutečností, že mikrosatelitní markery jsou kodominantní a multialelické, jsou vysoce reprodukovatelné, mají vysoké rozlišení a jsou založeny na polymerázové řetězové reakci (PCR).

Na obrázku č.8 je názorně ukázáno srovnání sekvencí DNA pro jednotlivé alely. Locus 1 je homozygotní, obě alely obsahují shodně (TA)<sub>4</sub>, Locusy 2 a 3 jsou heterozygotní.

Srovnání sekvencí DNA



Obrázek 8: Diagram srovnání sekvencí DNA (Freeland 2005)

### 3.2.5 Co jsou mikrosatelity

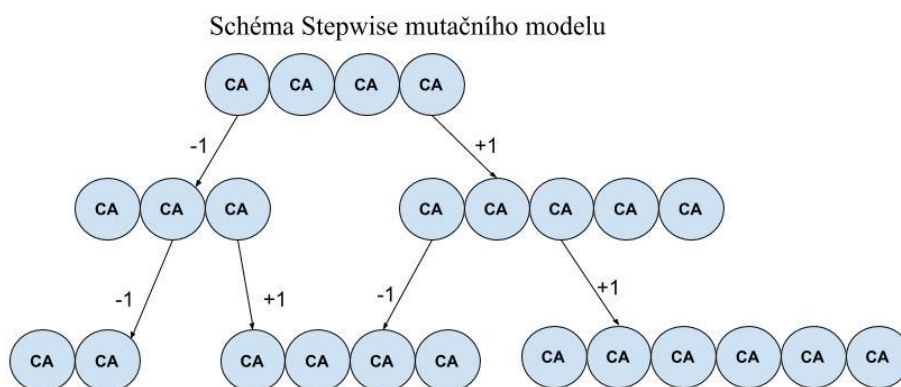
Mikrosatelity považují Bhargava & Fuentes (2010) za všudypřítomné jednoduché opakující se sekvence DNA, které jsou široce rozšířené jak v prokaryotickém, tak v eukaryotickém genomu a dokazují tak vysoký stupeň polymorfismu alel. Označují je jako SSR (Simple Sequence Repeats) krátké opakující se sekvence, STR (Short Tandem Repeats) krátké tandemové repetice, nebo VNTR (Variable Number Tandem Repeats) tandemové repetice s variabilním počtem opakování. Mikrosatelity obsahují několik párů bází (1-6), někteří autoři však za mikrosatelity považují i repetice se 7 až 9 opakováními a odlišují je tak od minisatelitů, které obsahují 10-100 párů bází.

Z hlediska struktury jsou mikrosatelity děleny na:

- dokonalé (Perfect), které neobsahují žádnou bázi nepatřící do opakujícího se motivu  
např: CTGTAAAAAAAAAAAGT
- nedokonalé (Imperfect), obsahující v motivu bázi, která do motivu nepatří  
např: CTGTAAAAATAAAAGT
- přerušené (Interrupted), jejichž motiv je na rozdíl od nedokonalých přerušeny sekvencí složenou z několika bází  
Např: CTGTAAAAATCGAAAAGT
- složené (Compound), poskládané zpravidla ze dvou opakujících se sekvencí.  
Např: CTGTAAAGGGAAAGGGAAAAGT

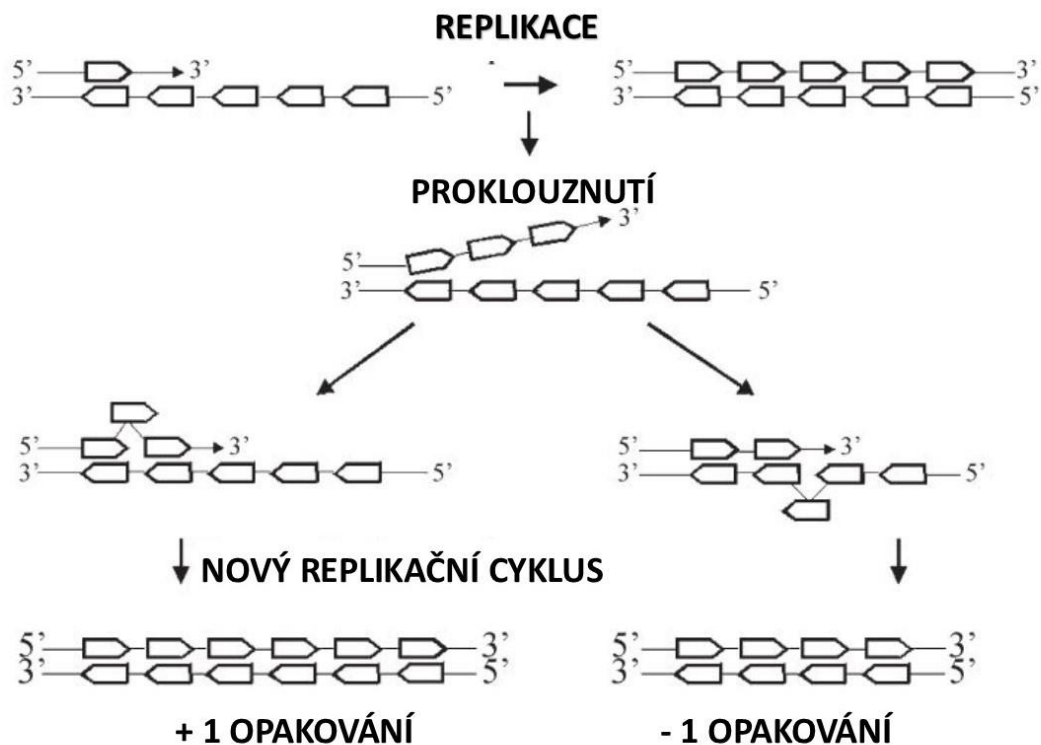
V genomu se nacházejí mnohdy dlouhé mikrosatelitové úseky, které vznikají expanzí kratších úseků. Mikrosatelitové sekvence se vyskytují jen zřídka v oblastech kódující DNA. Udává se, že se jedná pouze o 9–15% mikrosatelitů a tuto skupinu tvoří převážně tri- a hexanukleotidové repetice, které neporušují čtecí rámec (Hancock 1995). Oliveira et al. (2006) uvádí, že mikrosatelity buď vlastní genom neovlivňují, nebo naopak ovlivňují expresi a/nebo funkcionalitu některých genů. Příkladem může být (CT)<sub>n</sub> motiv u *Arabidopsis*, který ovlivňuje transkripci. Goldstein & Schlotterer (1999) popisují, že v současné době pochází přímé důkazy o zapojení mikrosatelitů v genových funkcích ze studií genetických poruch, které jsou výsledkem expanze trinukleotidů.

Ellegren (2004) uvádí jako pravděpodobný mechanismus vzniku mikrosatelitů z hlediska evoluce SMM (Stepwise Mutation Model). SMM předpokládá, že mutace upravují délku repetiční řady pomocí přidání nebo odebrání repetiční jednotky s danou četností, nezávisle na délce repetice. Tento model se používá při porovnávání dvou různých skupin, například populací, nebo živočišných nebo rostlinných druhů, pro odhad genetické vzdálenosti mezi nimi.



Obrázek 9: Stepwise mutation model. Zpracováno podle (Ellegren 2004)

Dalším možným mechanismem v evoluci mikrosatelitů je DNA slippage. Oliveira et al. (2006) uvádí, že během replikace nebo oprav DNA může nastat tzv. proklouznutí DNA (DNA slippage). Během proklouznutí se jedno z vláken DNA dočasně oddálí od vlákna druhého a rychle se znovu naváže na nové pozici. To vede k chybám v párování bází a, v případě nového vlákna, postupnému prodlužování vlákna, čímž roste i počet opakování repetit v alele. Pokud proklouznutí DNA nastane na vodícím vlákně, dochází ke zkracování nového vlákna a ke snižování počtu repetit. Schéma proklouznutí je uvedeno na obrázku č. 10.



Obrázek 10: Schéma DNA Slippage. Upraveno podle (Oliveira et al. 2006)

Ačkoli je analýza mikrosatelitů v současné době využívána pro širokou oblast biologických aplikací, v blízké budoucnosti bude v některých případech nahrazena novými genetickými markery na bázi SNP (Single Nucleotide Polymorphism) nebo AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), například na mapování genomu (Goldstein & Schlotterer 1999).

### 3.3 PCR

Metoda PCR byla objevena v roce 1983 americkým biochemikem Karym Mullisem. Teoreticky byla popsána již v roce 1971, ale Kary Mullis byl první, který tuto metodu dokázal realizovat v praxi. O deset let později, v roce 1993, byl za tento objev oceněn Nobelovou cenou v oboru chemie (Clark 2005).

PCR neboli polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction) je biotechnologická metoda založená na množení (amplifikaci) požadovaného úseku DNA *in vitro*. K amplifikaci se používá speciální DNA-polymeráza. Odtud tedy název polymerázová řetězová reakce. Řetězová se nazývá proto, že amplifikované jednotky vznikají řetězovou reakcí a jejich počet roste exponenciální řadou: 2, 4, 8, 16, 32, 64, ...atd. Z jednoho úseku DNA, který amplifikujeme tak může vzniknout při 35 cyklech až  $2^{35}$  kopií. Původně se používala pro PCR

analýzu polymeráza získaná z bakterie *Escherichia coli*. Tato polymeráza však byla teplotně nestabilní a docházelo k její inaktivaci, proto musela být pravidelně dodávána při každém amplifikačním cyklu. Dnes se již používá Taq-polymeráza, která je získávána z termofilních bakterií *Thermus aquaticus*, a během teplotně denaturačního kroku zůstává aktivní. Nesporná výhoda Taq-polymerázy spočívá v tom, že se jí může dodat nadbytek již při přípravě směsi pro PCR a nemusí tak být doplňována po každém cyklu. PCR je dále řízena pouze postupným střídáním teploty. Zařízení pro PCR, tzv. termální cyklery automaticky mění teplotu a mohou pojmout velké množství vzorků, což dělá amplifikaci specifických sekvencí DNA relativně jednoduchou (Snustad & Simmons 2012).

Jak dále popisují Snustad & Simmons (2012), nevýhodou Taq-polymerázy je absence autokorekční aktivity ve směru 3'-5'. V případě potřeby vysoké přesnosti, je Taq-polymeráza nahrazována některou z dalších teplotně stabilních polymeráz, které mají potřebnou autokorekci:

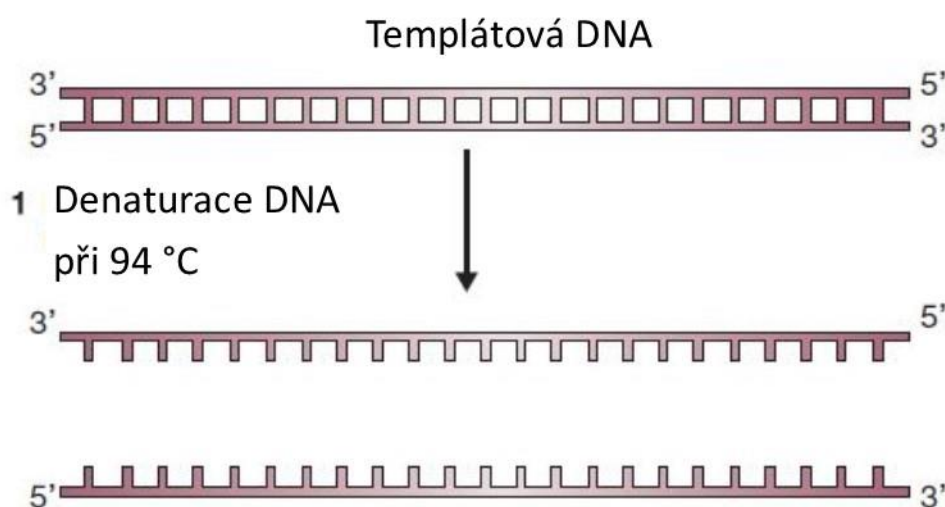
- Pfu-polymeráza (*Pyrococcus furiosus*)
- Tli-polymeráza (*Thermococcus litoralis*)
- Tfl-polymeráza (*Thermus flavus*) – pro řetězce o délce 10-35 kb

### 3.3.1 Základní kroky PCR

Polymerázová řetězová reakce simuluje v *in vitro* podmínkách proces replikace. Při iniciaci replikace vznikají pomocí složitého enzymatického komplexu jednovláknové úseky matricové (templátové) DNA. Tato etapa amplifikace je u PCR realizována tepelnou denaturací templátové dsDNA. RNA primery katalyzované u *in vivo* replikace primázou jsou u SPLAT nahrazeny dvěma (u RAPD jedním) ssDNA primery s volnou hydroxylovou skupinou na 3'konci. Navázání těchto primerů na základě komplementarity na vlákno templátové DNA je označováno anglickým výrazem „annealing“. Tento termín je v současnosti používán mezinárodně. Prodlužování (extense) nově vznikajícího řetězce je stejně jako elongace u *in vivo* replikace realizováno pomocí DNA-polymerázy ve směru 3'-5' (Vejl 1997).

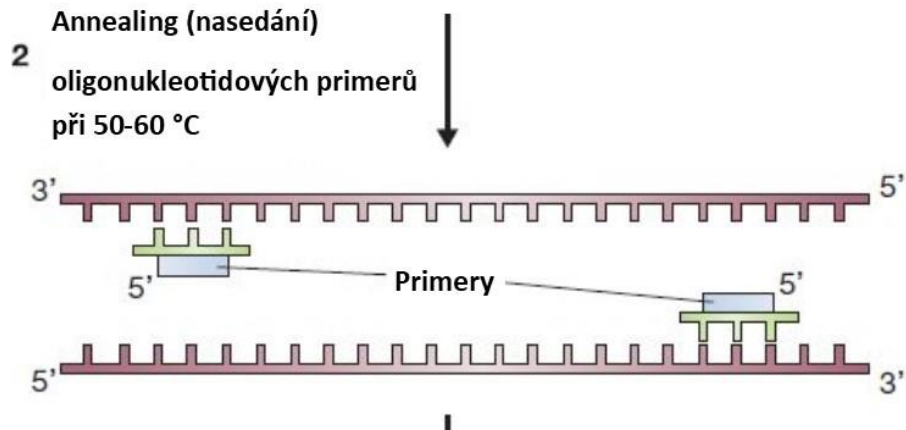
Brown (2010) popisuje jednotlivé kroky PCR takto:

**Denaturace** – Směs je zahřáta na 94 °C, při této teplotě se rozpadají vodíkové můstky, které drží obě vlákna dsDNA pohromadě. Ta se pak rozpadá na dvě samostatná vlákna. Denaturace trvá mezi 30 a 120 s.



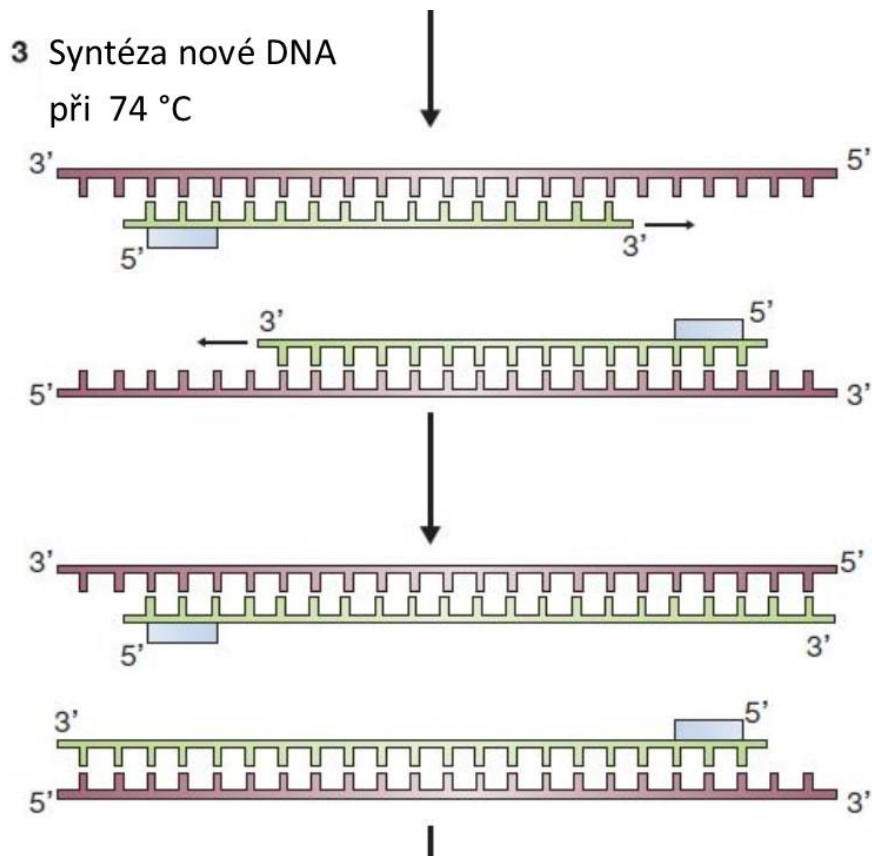
Obrázek 11: PCR Denaturace dsDNA. Upraveno podle (Brown 2010)

**Annealing** – Směs je schlazena na 50-60 °C. Primery přítomné ve směsi nasedají na jednotlivá vlákna. Primery jsou krátké úseky DNA o délce 18-26 bp. Při nasedání je využívána komplementarita bází. Annealing trvá cca 1 minutu.



Obrázek 12: PCR Annealing. Upraveno podle (Brown 2010)

**Elongace** – Směs je zahřata na 72 °C. Během prodlužování dochází k připojování volných dusíkatých bází k vláknu DNA a vytváření vlákna nového. Principem je komplementarita bází, katalyzátorem některá z termostabilních polymeráz. Doba elongace se pohybuje mezi 15 a 180 s. Poslední cyklus PCR obsahuje prodlužovací fázi obvykle delší – přibližně 10 minut. Tento krok umožní dokončení DNA polymerace u většiny navázaných primerů. Po ukončení amplifikace bývá obvykle zařazován cyklus zchlazení vzorků na 4-5 °C, které umožní uchování amplifikované DNA několik hodin v termocykleru (Vejl 1997).



Obrázek 13: PCR Elongace. Upraveno podle (Brown 2010)

Počet cyklů – je závislý na optimalizaci složení reakce a na množství templátové molekuly DNA. V případě 50 molekul templátu je doporučováno 40–45 cyklů, při  $1 \cdot 10^3$  molekul 35-40 cyklů, při  $1,5 \cdot 10^4$  molekul 30-35 cyklů a při  $3 \cdot 10^5$  molekul postačí 25-30 cyklů. Vyšší počet cyklů může způsobit vyšší frekvenci nespecifických PCR produktů (Vejl 1997).

### 3.3.2 Elektroforetická separace

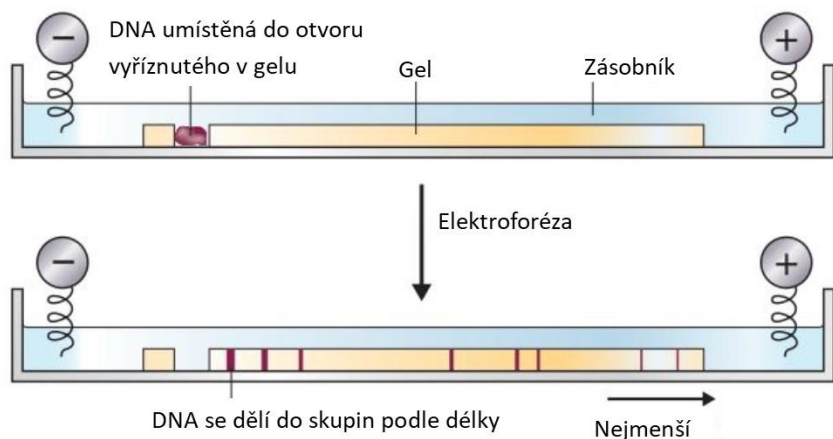
Elektroforetická separace se využívá pro vizualizaci výsledků PCR.

Při neutrálním pH je výsledný náboj DNA negativní. DNA pak v elektrickém poli migruje ve směru katoda (-) – anoda (+). Elektroforetická mobilita DNA fragmentů je závislá na velikosti oligonukleotidů (bp) a nezávislá na sekvenci bází. Platí, že čím je fragment kratší, tím rychleji prostupuje gelem.

DNA fragmenty lze separovat pomocí agarózové gelové elektroforézy, polyakrylamidové gelové elektroforézy a agarózo-akrylamidové gelové elektroforézy. Složení gelů a pufrů může vytvářet nedenačovací nebo denačovací prostředí.

DNA je na agarózových gelech vizualizována pomocí barvení ethidium bromidem. Ethidium bromid je vázán do řetězce DNA. Po ozáření UV paprsky (254nm) dochází k absorpci záření molekulou DNA. Vlnové délky 302 – 366nm jsou absorbovány ethidium bromidem. Energie je následně reemitována v podobě záření o vlnové délce 590nm v červeno-oranžové oblasti viditelného spektra (Vejl 1997).

Jak uvádí Hruban (1999) je pro analýzu mikrosatelitů ideální metoda separace pomocí polyakrylamidového gelu. Při ní můžeme spolehlivě rozlišovat fragmenty od délce 100–1000 bp dsDNA (při koncentraci 3,5 %), nebo 5-100 bp (při koncentraci 20 %). V optimálních podmínkách můžeme docílit rozlišení fragmentů s rozdílem jediného páru nukleotidů. Tato přesnost se využívá právě u mikrosatelitní DNA. Pro srovnání uvádím, že rozlišovací schopnost klasického agarózového gelu je mezi 50 a 500000 bp v závislosti na koncentraci gelu.



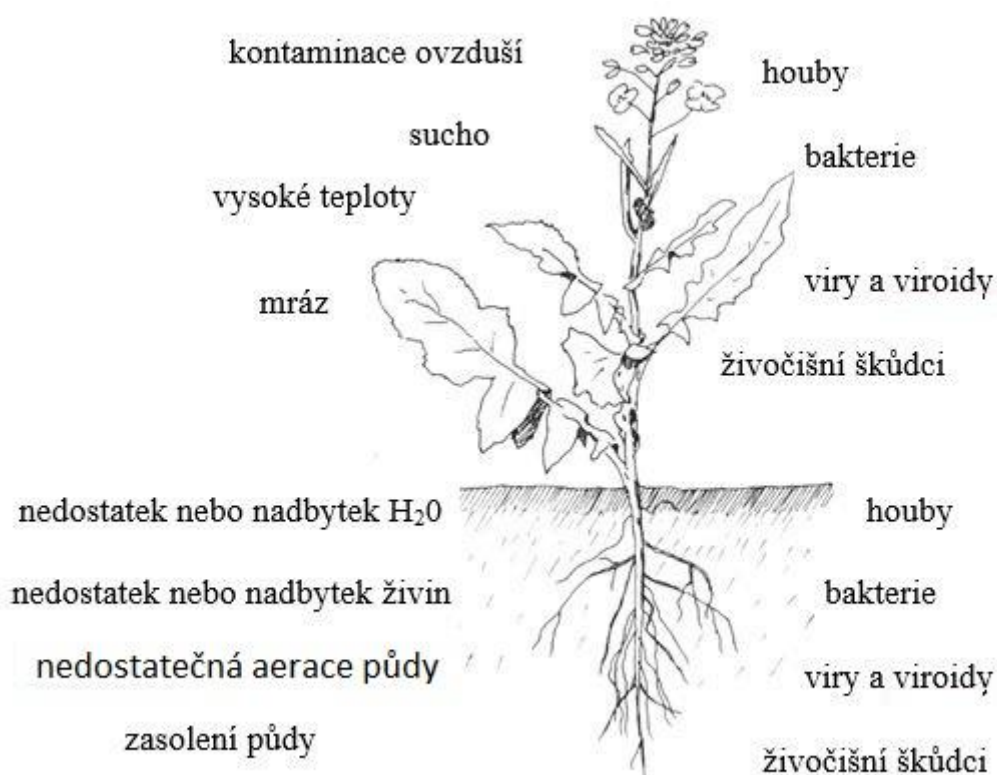
Obrázek 14: Gelová elektroforéza. Upraveno podle (Brown 2010)

Na obrázku č. 14 je znázorněna migrace fragmentů DNA v elektrickém poli a její rozřazení podle délky fragmentů. (Od nejdelších vlevo po nejkratší vpravo.)

### 3.4 Rezistenční šlechtění

Rezistenční šlechtění považují Odenbach & Sacristan (1997) za jednu z nejdůležitějších částí integrované ochrany rostlin v současnosti. Pěstování rezistentních plodin snižuje náklady na jinak nezbytnou chemickou ochranu. Omezení chemické ochrany rostlin má vliv na nižší zátěž životního prostředí kontaminujícími biocidními látkami. Velmi důležité je i výrazně nižší zatěžování produktů zemědělství rezidui ochranných chemických prostředků. Rezistenční šlechtění se zaměřuje na snížení dopadu negativního vlivu některých biotických a abiotických faktorů. Jejich seznam je uveden na obrázku č.15.

Pod pojmem rezistentní šlechtění se označuje šlechtitelský proces cílený na vznik odrůdy s požadovanou rezistencí. Odolnost proti biotickým i abiotickým faktorům je v současné době velice aktuální. Tyto cíle jsou součástí většiny šlechtitelských programů. Cílem rezistentního šlechtění je získat odrůdu, která bude vykazovat trvalou polní odolnost, jejíž projev bude minimálně ovlivňován vnějšími negenetickými faktory (Vejl et al. 2002).



Obrázek 15: Biotické a abiotické faktory. Upraveno podle (Odenbach & Sacristan 1997)

#### 3.4.1 Co je rezistence

Vejl et al. (2002) definuje rezistenci/patogenitu jako vztah mezi genotypem hostitele a genotypem patogenu. Rezistence je dědičně založená schopnost hostitelské rostliny odolávat patogenům. Patogenita představuje schopnost patogena napadat druh daného hostitele. Označení patotyp nebo rasa nebo biotyp charakterizuje populaci patogena tvořenou jedinci se stejnou patogenitou. Genotypy hostitelské rostliny, které spojuje rezistence vůči shodnému patotypu, bývají označovány jako patodem. Vztah mezi patogenem a hostitelem studoval zejména FLOR (1956), který vytvořil hypotézu „gen proti genu“ (Gen to Gen). Podle této hypotézy odpovídá každému genu rezistence u hostitele určitý gen avirulence u patogena. Obvykle je rezistence a virulence vlastností dominantní. Náchylnost a avirulence bývají obvykle recesivní.

Tabulka 1: Teorie gen proti genu. Upraveno podle (Vejl et al. 2002)

Gen proti genu		Genotyp rostliny	
		R1 r2	r1 R2
Genotyp patogena	a1 A2	Náchylná	Rezistentní
	A1 a2	Rezistentní	Náchylná

A proti r Náchylnost

A proti R Rezistence

Vejl et al. (2002) dále rozlišuje následující druhy rezistencí:

#### **Vertikální rezistence**

Označení tohoto typu rezistence vychází z teorie Van der Plancka z roku 1968. Je definována jako rasově specifická rezistence pouze vůči některým rasám patogena. Jejím projevem je často hypersenzitivní reakce, která je vůči konkrétní rase vysoce účinná. Vertikální rezistence je snadno překonatelná novými rasami patogena.

#### **Horizontální rezistence**

Rovněž toto označení vychází z teorie Van der Plancka. Tato rezistence je definována jako rasově nespecifická. Je založena polygenně souborem minorgenů. Její účinek není oproti vertikální rezistenci tak výrazný. Obvykle dochází k zpomalení vývoje patogena a prodloužení inkubační doby. Své uplatnění nachází zejména u polycyklických chorob. Vzhledem k jejímu polygennímu založení je více ovlivňována faktory vnějšího prostředí. Ze stejných důvodů je však oproti vertikální rezistenci výrazně trvalejší. Tento typ rezistence bývá někdy označován jako rezistence částečná neboli parciální.

#### **Kvantitativní a kvalitativní rezistence**

Kvantitativní rezistence je typická tím, že projevy rezistence jsou různě intenzivní a jejich variabilitu lze označit jako plynule proměnlivou. Naopak kvalitativní rezistence je charakteristická tím, že její projevy dosahují extrémních diferencí obvykle dvou kategorií – rezistentní a nerezistentní

#### **Monogenně a polygenně determinovaná rezistence**

Pod těmito pojmy je zahrnuto stejné rozdělení jako v předešlém odstavci. Monogenní dědičnost, která je řízena jedním majorgenem, odpovídá kvalitativní rezistenci a polygenně determinovaná rezistence odpovídá kvantitativní rezistenci.

#### **Specifická a nespecifická rezistence**

Toto rozdělení vychází z variability patogena, který může vytvářet větší počet ras. Je-li odrůda rezistentní pouze vůči několika málo rasám, hovoříme o rezistenci specifické. Je-li naopak rezistentní vůči všem rasám patogena, potom hovoříme o rasově nespecifické rezistenci.

#### **Tolerance**

Tolerance je definovaná jako schopnost odrůdy snášet napadení patogenem bez výrazného snížení výnosu nebo zhoršení kvality produkce.

#### **Imunita**

Imunita je nejvyšší stupeň rezistence, kdy na rostlině nejsou zjištěny žádné symptomy napadení.



### 3.4.2 Genetické markery v rezistenčním šlechtění

V předešlých letech byly optimalizovány molekulární markery řady genů, které jsou prakticky využitelné ve šlechtění jabloní. Pomocí těchto markerů je možné charakterizovat a následně selektovat požadované genotypy již v raných fázích vývoje. Vávra et al. (2015) konkrétně popisuje optimalizované markery následujících genů:

Co sloupcový růst

*Rvi2* rezistence vůči strupovitosti

*Rvi4* rezistence vůči strupovitosti

*Rvi6* rezistence vůči strupovitosti

*Rvi8* rezistence vůči strupovitosti

*Rvi15* rezistence vůči strupovitosti

*PI1* rezistence vůči padlí jabloňovému

*FBF7QTL* rezistence vůči spále růžovitých

lokus náchylnosti vůči *Botryosphaeria dithidea*

*Md-ACO1* měknutí plodů

*Md-ACS1* měknutí plodů

*Md-MYB* červené zbarvení dužniny a slupky plodů

Markery jsou založeny na principu PCR, PCR-RFLP, SSR a SNP. Byly vyvinuty rovněž postupy multiplex PCR pro současné hodnocení většího počtu markerů s automatickým vyhodnocováním pomocí fragmentační analýzy na kapilární elektroforéze (Vávra et al. 2015).

### 3.4.3 Strupovitost jabloní (*Venturia inaequalis*)

Strupovitost je nejvážnější chorobou jabloní. Vyskytuje se po celém světě. Preferuje stanoviště s chladnými vlhkými jary a léty. Její škodlivost spočívá v redukci kvality infikovaného ovoce. Strupovitost také redukuje velikost plodů, způsobuje opadávání nezralých plodů, defoliaci a nepříznivě ovlivňuje tvorbu plodů v příštím roce. Strupovitost je zodpovědná za 70 % (nebo i více) všech škod na výnosech jablek celosvětově (Agrios 2004). Viz obr. č. 16.



Obrázek 16 : Plody napadené strupovitostí. (Agrios 2004)

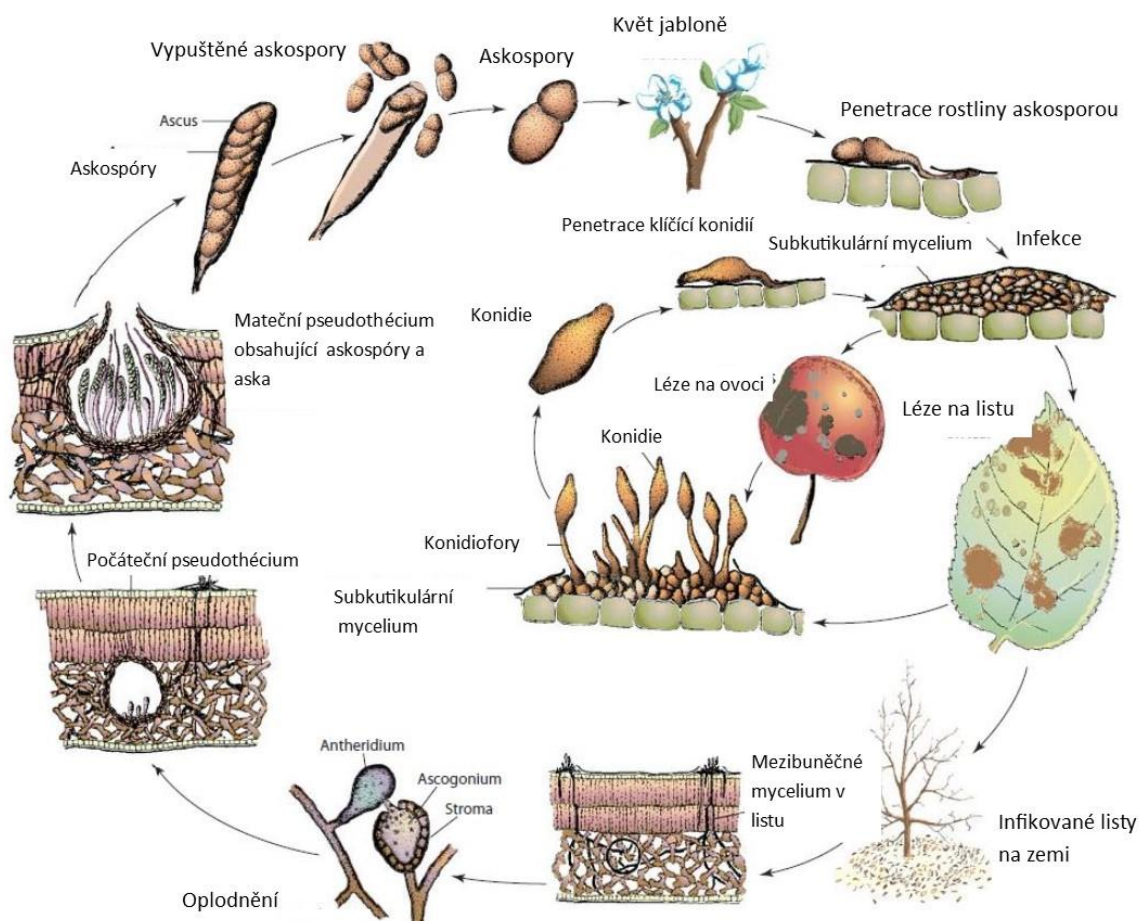
Původcem strupovitosti je houba *Venturia inaequalis* CKE. Taxonomicky se tento patogen řadí do oddělení vlastních hub (*Eumycota*), třídy vřeckatých hub (*Ascomycetes*), řádu *Pseudosphaeriales*. Viz obr. č.17.



Obrázek 17: *Venturia inaequalis*, Ascospory pod mikroskopem (Agrios 2004).

Houba vytváří pohlavní (vřeckaté stádium) a nepohlavní cyklus (konidiové stadium). Patogen přežívá zimu v saprofytické fázi v odumřelých a opadaných listech ve formě pseudoperitécií, v kterých vyrůstá větší počet vřecek. V odumřelých listech dochází k novému intenzivnímu růstu mycelia, které prorůstá celým listem. Tvoří se stroma a v něm se začíná diferencovat základ pseudoperitécia, v nichž je obsaženo velké množství vřecek – v průměru 122. Vřecka jsou osmisporová, askospory jsou dvoubuněčné, olivově hnědé. Vřecka zrají postupně během několika týdnů od dubna přibližně v době, kdy se rozvíjejí pupeny na jabloních až do června. Doba zralosti pseudoperitécií, uvolňování askospor (primární infekce), klíčení askospor a rozrůstání mycelia v mezibuněčných prostorách listů závisí na zvlhčení deštěm nebo silnou rosou a teplotě vzduchu. Subkutikulární nebo intraepidermální mycelium je charakteristicky paprscitě větvené, středně až tmavě hnědé (Vejl et al. 2005).

Konidiofory jsou válcovité, světle až olivově hnědé. Konidie se tvoří na konci konidioforu, obvykle jsou jednobuněčné, starší někdy dvoubuněčné. Tvoří se zpravidla od konce května po celé vegetační období, rozšiřují se téměř výhradně deštěm a mohou způsobit infekci ještě krátce před sklizní – sekundární infekce (Dvořák et al. 1976). Životní cyklus strupovitosti jabloní je znázorněn následujícím obrázkem.



Obrázek 18: Životní cyklus *Venturia inaequalis*. Upraveno podle (Agrios 2004)

Vejl et al. (2005) uvádí, že mezi základní způsoby ochrany jabloní proti strupovitosti patří:

- Dodržení základní agrotechniky (vhodný řez a úprava hustoty koruny)
- Chemická ochrana (fungicidy)
- Rezistentní šlechtění

Vávra et al. (2015) popisuje, že odolnost jabloní vůči strupovitosti je podmíněna přítomností určitých genů rezistence. Ve šlechtění nových odrůd jsou nejčastěji využívány lokusy *Rvi6* a *Rvi7*, jejichž donorem je *Malus floribunda* klon 821, avšak tyto lokusy jsou v současnosti již překonány novými rasami patogena.

Tartarini et al. (1999) navrhnul kodominantní marker AL07 pro detekci genu (*Vf*) *Rvi6*.

Pro účely PCR se využívají následující primery:

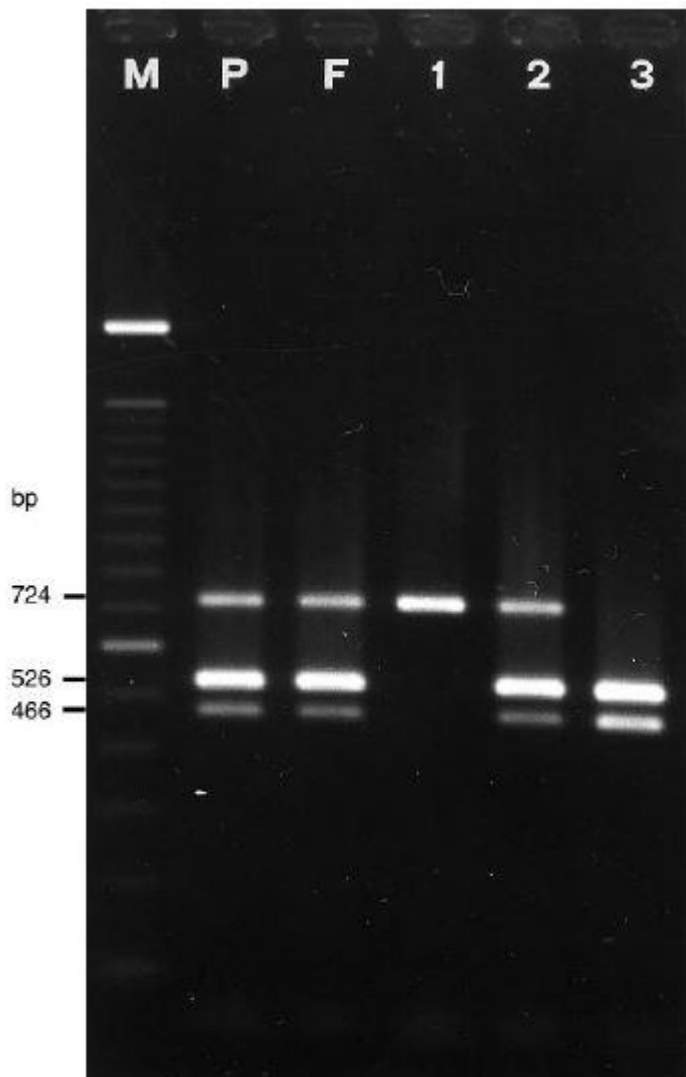
**F (5'-TGGAAGAGAGATCCAGAAAGTG-3')** o délce 22 bp

**R (5'-CATCCCTCCACAAATGCC-3')** o délce 18 bp

Fragment o délce 466 bp charakterizuje dominantní alelu *Rvi6*, fragment o délce 724 bp pro recesivní alelu *Rvi6*. Tartarini et al. (1999) dále uvádí, že oba fragmenty byly prakticky totožné. Lišily se pouze jednou insercí o délce 258 bp u delšího z fragmentů. Druhý z navržených markerů AM19 je dominantní a využívá primery:

**F (5'-CGTAGACGGAATTTGAGAGTG-3')** o délce 22 bp

**R (5'-GACAAAGGGCTTAAGTGCTCC-3')** o délce 21 bp



Obrázek 19: PCR AL07 a AM19 (Tartarini et al. 1999)

Na obrázku číslo 19 je srovnání dvou rodičovských a tří hybridních rostlin. Použity byly markery AL07 a AM19. U AL07 je fragment o délce 466 bp (A) dominantní, fragment o délce 724 bp (a) recesivní. Marker AM19 je dominantní, fragment o délce 526 bp je (A.).

**P (odrůda Prima)** je rezistentní, u AL07 (Aa) a u AM19 (A.)

**F (odrůda Florina)** je rezistentní u AL07 (Aa) a u AM19 (A.)

**1** (aa) u obou markerů

**2** (Aa) u AL07 a (A.) u AM19

(AA) u AL07 a (A.) u AM19

**M** je měřítko se stupnicí po 100 bp (Tartarini et al. 1999)

Na začátku procesu šlechtění nových odrůd se u semenáčků vzniklých záměrným křížením vybraných rodičovských komponent dělají primární selekce na odolnost pomocí umělých infekcí patogenem *V. inaequalis*.

Pro hodnocení stupně odolnosti nebo napadení semenáčků je doporučeno použít bonitační stupnici 0–4.

Tabulka 2: Třídy reakcí semenáčků během infekčního testu (Vejl et al. 2002)

Třídy	Charakteristika
<b>0</b>	Žádné makroskopicky pozorovatelné symptomy. Imunní reakce.
<b>1</b>	Málo nebo více drobných jamek velikosti špendlíkových hlaviček (průměr asi 0,5mm), které se objeví přibližně za 2,5 dne po infekci. Bodové skvrny někdy splývají ve skvrny o průměru 1–2 mm. Sporulace se nevyskytují.
<b>2</b>	Pravé nebo nepravé chlorotické nebo nekrotické skvrny o průměru 2-5 mm Žádná sporulace – středně rezistentní reakce.
<b>M</b>	Třída mezi třídami 2 a 3. Směs nekrotických a chlorotických nesporelujících skvrn. Několik poranění s ohraničenou sporulací.
<b>3</b>	Omezený výskyt nektróz. Slabé, ale viditelné konidiové sporulace: Citlivá reakce. Listy neopadávají. Poranění vytvářející nečetnou a omezenou sporulaci.
<b>4</b>	Silný výskyt nektróz s pozorovatelnou sporulací. Infikované listy předčasně opadávají – vysoce citlivá reakce. Klasická poranění s velmi vysokou sporulací

Jako odolné jsou označeny hybridy bez příznaků a skupiny 1,2 a M. Hybridy ze skupiny 3 a 4 jsou vyřazeny jako citlivé. Další hodnocení se provádí v polních podmínkách (Vejl et al. 2002).

Následně se u vybraných jedinců provedou detekce přítomnosti genů rezistence s využitím molekulárních markerů. Využití molekulárních markerů je rovněž nezbytné při tvorbě pyramidální rezistence, vzhledem k tomu, že detekce kumulace genů rezistence k jednomu patogenu by byla velmi obtížná jen na základě fenotypového projevu po infekci.

Přehled genů rezistence vůči strupovitosti a jejich zdrojů je uveden v následující tabulce.

Tabulka 3: Zdroje rezistence vůči strupovitosti (Bus et al 2011)

<i>Malus</i>		<i>Venturia inaequalis</i>						
	Fenotyp	Lokus rezistence		Lokus avirulence		Rasa	Referenční vzorek	
označení		starý	nový	Nový	Starý		Virulence	Avirulence
h(0) Royal Gala	Citlivé	-	-			(0)		
h(1) Golden Delicious	Nektróza	Vg	Rvi1	AvrRvi1		(1)	EU-B04	1066E
h(2) TSR34T15	Hvězdicovitá nektróza	Vh2 = Vr-A	Rvi2	AvrRvi2	p-9	(2)	1639	EU-B04
h(3) Geneva	Hvězdicovitá nektróza	Vh3	Rvi3	AvrRvi3	p-10	(3)	EU-NL24	EU-B04
h(4) TSR33T239	Hypersenzitivní reakce	Vh4 = Vx = Vr1	Rvi4	AvrRvi4		(4)		EU-B04
h(5) 9-AR2T196	Hypersenzitivní reakce	Vm	Rvi5	AvrRvi5		(5)	147	EU-B04
h(6) Priscilla	Chloróza	Vf	Rvi6	AvrRvi6		(6)	EU-D42	EU-B04
h(7) Malus x floribunda 821	Hypersenzitivní reakce	Vfh	Rvi7	AvrRvi7		(7)	1066E	EU-B04
h(8) B45	Hvězdicovitá nektróza	Vh8	Rvi8	AvrRvi8		(8)	NZ188B.2	EU-B04
h(9) K2	Hvězdicovitá nektróza	Vdolgo	Rvi9	AvrRvi9	p-8	(9)	1639	EU-B04
h(10) A723-6	Hypersenzitivní reakce	Va	Rvi10	AvrRvi10		(10)	413	EU-NL24
h(11) A722-7	Hvězdicovitá nektróza	Vbj	Rvi11	AvrRvi11		(11)		EU-B04
h(12) Hansen's baccata #2	Chloróza	Vb	Rvi12	AvrRvi12		(12)		EU-B04
h(13) Durello di Forlí	Hvězdicovitá nektróza	Vdolgo	Rvi13	AvrRvi13		(13)	EU-NL05	EU-B04
h(14) Dülmener Rosenapfel	Chloróza	Vdr1	Rvi14	AvrRvi14		(14)	301	EU-B04
h(15) GMAL2473	Hypersenzitivní reakce	Vr2	Rvi15	AvrRvi15		(15)		EU-B04
h(16) MIS op 93.051 G07-098	Hypersenzitivní reakce	Vmis	Rvi16	AvrRvi16		(16)		
h(17) Antonovka APF22	Chloróza	Va1	Rvi17	AvrRvi17		(17)		
h(18) 1980-015-025	Hypersenzitivní reakce	V25	Rvi18	AvrRvi18		(18)		

Dalším typem odolnosti jabloní vůči strupovitosti je polygenně determinovaná rezistence. Polygenní založení rezistence je obecně velice obtížně markerovatelné ve srovnání s monogenním typem rezistence. Tento typ odolnosti je charakteristický pro řadu starších odrůd jabloní, které vykazují malou citlivost vůči strupovitosti. Přehled zdrojů polygenní rezistence vůči strupovitosti uvádí Vejl et al. (2005) následující tabulce.

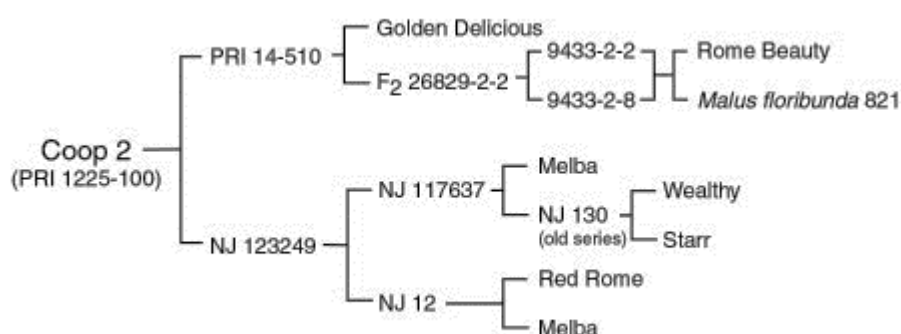
Tabulka 4: Zdroje polygenní rezistence vůči strupovitosti (Vejl et al. 2005)

Polygenní rezistence	Selektované semenáčky <i>Malus baccata</i>
	<i>Malus sargentii</i> 843
	<i>Malus sieboldii</i> 2982-22
	<i>Malus zumii calocarpa</i>
	<i>Malus toringo</i> 852

Jak uvádějí Dayton & Williams (1970), první rezistentní odrůda Prima byla získána mezidruhovou hybridizací s *Malus floribunda* Sieb. Dnes již existují již stovky odrůd jabloní, které mají tento majorgen. Taktéž v České republice vznikají odrůdy s genem *Vf*. Patří mezi ně například: Aneta, Biogolden, Goldstar, Hana, Jolana, Karmina, Melodie, Nela, Otava, Rajka, Resista, Rosana, Rubinola, Topaz a Vanda (Vejl et al. 2003).

Crosby et al. (1992) zmiňují historii rezistentního šlechtění jabloní vůči strupovitosti. Cílem bylo vyšlechtit rezistentní odrůdy, kdy si ve 40. a 50. letech 20. století stanovila 3 experimentální pracoviště univerzit v USA (Purdue University, Rutgers University a University Illinois), zanést do kulturních jabloní donor rezistence z plané odrůdy *M. floribunda* – klon 821 s genem *Rvi6*. Později se přidaly ještě evropská a kanadská pracoviště.

Při hybridizaci probíhala složitá křížení, s cílem přenést gen rezistence a zachovat kvalitu plodů kulturních jabloní. Celosvětově se v letech 1970–1992 podařilo vyšlechtit 48 rezistentů, z toho 37 neslo gen *Rvi6*. Jako první rezistentní odrůda s genem rezistence *Rvi6* vznikla odrůda Prima (s původním označením novošlechtění Coop 2– PRI 125-100). Na její vyšlechtění bylo potřeba 16 komponent (Crosby et al., 1992). Její rodokmen je znázorněn na následujícím obrázku (Dayton et al. 1970)



Obrázek 20: Rodokmen odrůdy Prima. Zdroj (Dayton et al. 1970)

Historii prvních rezistentních odrůd představují také Merwin et al. (1994) a společně s Crosby et al. (1992) uvádějí další odrůdy, které v letech 1970–1988 vznikly. V těchto letech bylo povoleno 6 rezistentů, a to: Priscilla, Sir Prize, Jonafree, Redfree, Dayton a Williams' Pride. Další hybridy byly rozeslány na ostatní šlechtitelská pracoviště, aby mohly být použity pro šlechtění

nových rezistentních odrůd. Např. takto vznikla odrůda McShay na pracovišti Oregon State University (USA), dále odrůda Priam, vyšlechtěná na pracovišti INRA ve Francii.

Mezinárodní projekt VINQUEST (Patocchi et al. 2020) vznikl jako reflexe na celosvětový problém vzniku a šíření nových ras *V. inaequalis* překonávajících monogenně podmíněnou rezistenci. Druhou důležitou oblastí zájmu konsorcia VINQUEST je vznik nových ras s rezistencí vůči různým typům fungicidních účinných látek. Projekt VINQUEST je koordinován švýcarskou výzkumnou stanicí ACW Research Centre Wädenswill. Do projektu se do roku 2019 zapojilo 41 partnerů z 22 členských států, včetně ČR (tab. 9). Výsledkem projektu je veřejné publikování hodnocení kolekce diferenciacních klonů rodu *Malus*, které umožňují charakterizovat rasové spektrum *V. inaequalis* v různých oblastech světa.

#### **3.4.4 Padlí jabloňové (*Podosphaera leucotricha*)**

Další chorobou jabloní je padlí jabloňové způsobené patogenem *Podosphaera leucotricha* (Vávra et al. 2015). Padlí jabloňové, stejně jako strupovitost jabloní, patří mezi nejvážnější a nejrozšířenější choroby jabloní. Tuto chorobu způsobuje vřeckovýtrusá houba *Podosphaera leucotricha* (Ell. & Evher.) Salm., která napadá pupeny, květenství, listy, větve i plody. První symptomy napadení jsou patrné na jaře na spodní straně listů a terminálních částech výhonů. Symptomy se mohou lišit v závislosti na odrůdě, na stupni a počátku infekce nebo na počasí. Optimální teplotní rozmezí pro rozvoj infekce leží mezi 19–22 °C, při relativní vlhkosti větší než 70 %, zatímco nízké zimní teploty (méně než – 24 °C) ničí mycelium přezimující v pupenech, čímž dochází k přirozené redukci zdroje primární infekce (Tureček et al. 2004).

Životní cyklus padlí jabloňového popisuje Vejl et al. (2002). Padlí jabloňové vytváří pohlavní (vřeckaté) a nepohlavní (konidiové) stádium. Jako mycelium přežívá zimu v listových nebo květních pupenech, které byly napadeny v předchozí sezóně. Po skončení období dormance pupenů mycelium obnovuje svůj růst a kolonizuje mladé výhony a posléze i květenství a plody. Postižené rostlinné orgány jsou pokryty stříbrným povlakem, který je tvořen sporama (konidii). Ukázky napadení výhonů a plodů a životní cyklus patogena jsou ukázány na následujících obrázcích.

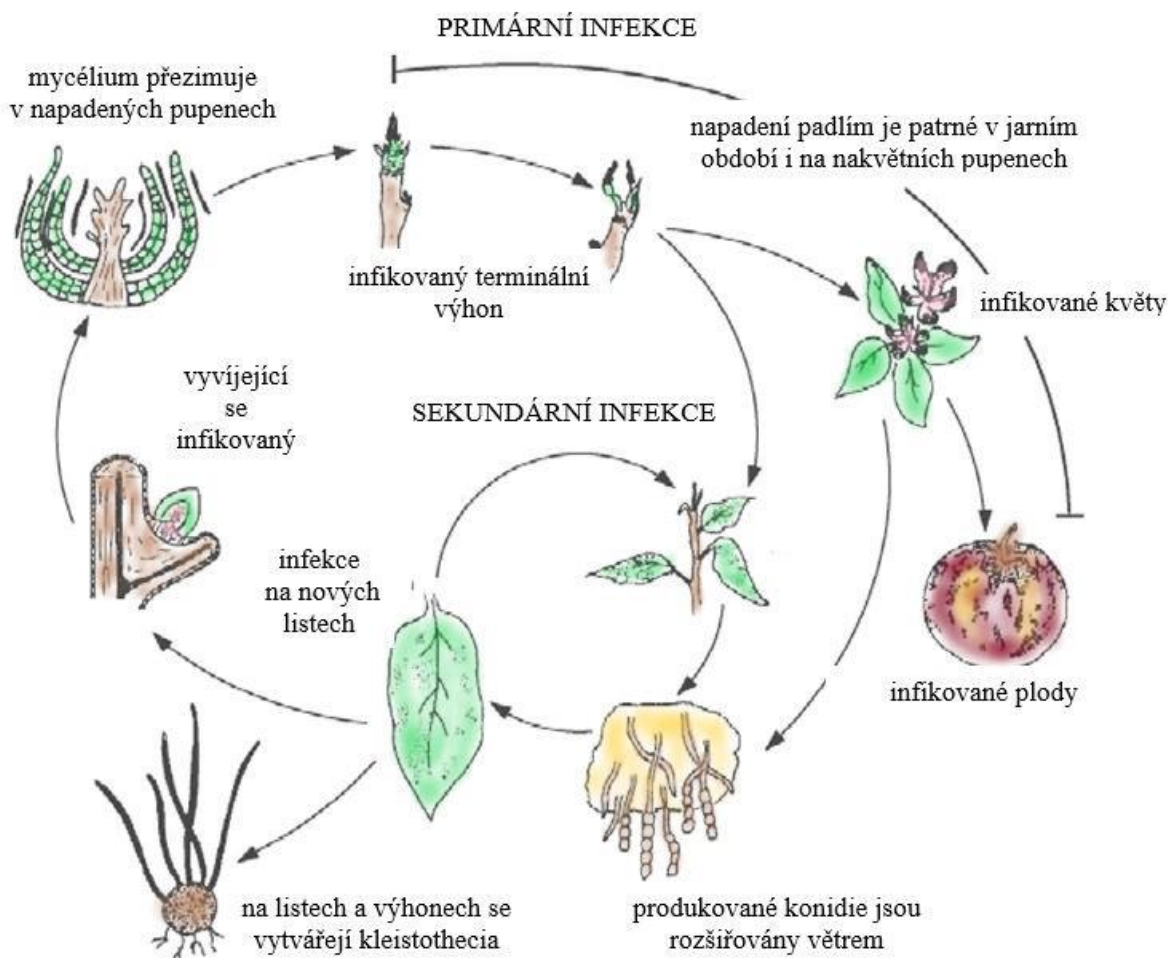


Obrázek 21: Příznaky padlí na rostlině. Vlastní foto



Obrázek 22: Příznaky padlí na ovoci. (Agrios 2004)





Obrázek 23: životní cyklus *P. Leucotricha*. Upraveno podle Vejl et al. (2002)

Rezistence vůči této chorobě je řízena několika majorgeny. Jak uvádí Vávra et al. (2015), nejvíce je využíván gen *PI1* původem z botanického druhu *Malus robusta*, později identifikované geny *PI-d*, *PI-m*, nebo gen *PI-w* z odrůdy 'White Angel'.

Částečnou odolnost vůči padlí vykazují i některé odrůdy bez výskytu majorgenů. Rezistence funguje na základě přítomnosti souboru minorgenů. Za odrůdy s polygenně řízenou rezistencí se označují: 'Worcester Pearmain', 'Golden Delicious' a 'Lord Lambourne'. Vávra et al. Dále prezentuje, že zajímavé výsledky přinesla porovnávání sekvencí v oblasti *PI1* genu se sekvencemi rodu *Malus*. Nejvyšší podobnost byla zjištěna se sekvencí, která odpovídá genu pro flavonoid 3'hydroxylázu. Mezi geny syntetizujícími flavonoidy (jako je například gen *MdMYB10*) a rezistencí vůči padlí mohou tedy existovat určité souvislosti. Nasvědčoval by tomu i fakt, že někteří kříženci *M. robusta* jsou současně donory *PI1* genu i *MdMYB10* genu (Vávra et al. 2015).

Molekulární marker genu *PI1*, řídící rezistenci vůči padlí jabloňovému.

Markery využívané pro studium rezistence k padlí jabloňovému (*Podosphaera leucotricha*) se zaměřují především na detekci jednotlivých majorgenů. Nejvýznamnějším DNA markerem, který se poprvé uplatnil v selekci genotypů vykazujících rezistenci vůči padlí jabloňovému a postihoval přítomnost nebo absenci majorgenu *PI1* původem z botanického druhu *Malus robusta*, byl RAPD marker OPAT 20 (Markussen et al. 1995). OPAT 20 je vazbový marker, který se nachází 4,5 cM od genu *PI1*. Později byl tento RAPD marker konvertován do SCAR PCR markeru AT20-450 (Frey et al. 2004). Nicméně, jak již bylo zmíněno výše, častou nevýhodou konvertovaných RAPD markerů je

tvorba nespecifických amplikonů, které mohou ovlivnit správné určení genotypu. Také SCAR marker AT-20-450 opakovaně poskytoval při testování řadu nespecificky amplifikujících fragmentů. Z toho důvodu byl navržen a optimalizován nový PCR marker *PI1C*(CZU) (Vávra et al. 2015).

#### Vazební PCR marker *PI1C*

Nově navržený *PI1C* marker vykazuje mendelistickou segregaci, je specifický a spolehlivě amplifikující a lze jej tudíž považovat za vhodný v procesu MAS. Přítomnost markeru je charakterizována fragmentem o velikosti 170 bp.

**PI1C-F**            5'-TGGTTCGGATAGCTGTTCC-3'

**PI1C-R**            5'-CTCGTCGGATCCCACAATAT-3'

Annelační teplota = 64 °C (Vávra et al. 2015).

### 3.5 Šlechtění na jakostní znaky plodů

#### 3.5.1 Barva slupky

Antokyany jsou zodpovědné také za červené zbarvení slupky plodu. Gen *MdMYBA* stejně jako *MdMYB10* patří do *MYB*-třídy transkripčních faktorů a také jejich translační produkty jsou si sekvenčně podobné (Vávra et al. 2015).

V rámci MAS byly identifikovány dva lokusy. Locus ***BC226-STS*** může nést tři alely (a1, a2, A1). Alelické kombinace a1a1, a1a2 a a2a2 predikují základní žluté zbarvení a alelické kombinace A1A1, A1a1 a A1a2 predikují základní červené zbarvení slupky. Určení jednotlivých alel má význam při záměrném šlechtění s cílem získat například žlutoplodou odrůdu křížením dvou červenoplodých odrůd, které kromě dominantní A1 alely obsahují jednu z recesivních alel a1 nebo a2.

Původní PCR markery lokusu *BC266-STS* konvertoval z RAPD markeru Cheng et al. (1996). Nevýhodou konvertovaných RAPD markerů je tvorba nespecifických amplikonů. Problematická byla rovněž identifikace alel, protože markerující fragmenty vykazovaly malé velikostní rozdíly a při velikosti amplikonů nad 1100 bp jsou tyto diference pomocí agarózové elektroforézy obtížně identifikovatelné. Proto byly navrženy dva nové primerové páry Barva a1-F/R a Barva-a2-F/R. Tyto nové PCR markery již vykazují vysokou specifičnost. Primerový pár Barva-a1-F + Barva-a1-R poskytoval u alely a1 předpokládaný fragment o velikosti 215 bp. U alel A1 a a2 byl amplikon velký 138 bp. Primerový pár Barva-a2-F + Barva-a2-R poskytoval u alely a2 fragment o velikosti 286 bp, u alel A1 a a1 byla velikost amplikonu 123 bp. Následující tabulka znázorňuje velikost amplikonů u jednotlivých alelických kombinací, ukázkový elektroforeogram je na obrázku č.24 a 25.

Tabulka 5: - Velikost amplifikovaných fragmentů při použití primerů Barva-a1 a Barva-a2 (Vávra et al. 2015)

Genotyp	Kombinace primerů	
	Barva-a1-F + Barva-a1-R	Barva-a2-F + Barva-a2-R
<b>a1a1</b>	215 bp 155 bp nemarkerující fragment	123 bp
<b>a2a2</b>	155 bp nemarkerující fragment 138 bp	286 bp
<b>a1a2</b>	215 bp 155 bp nemarkerující fragment 138 bp	286 bp 123 bp
<b>A1A1</b>	155 bp nemarkerující fragment 138 bp	123 bp
<b>A1a1</b>	215 bp 155 bp nemarkerující fragment 138 bp	123 bp
<b>A1a2</b>	155 bp nemarkerující fragment 138 bp	286 bp 123 bp

Primery použité k amplifikaci markeru BC266-STS.

**Barva-a1-F** 5'-GGGCGTGTGGAGAGTATCAT-3'

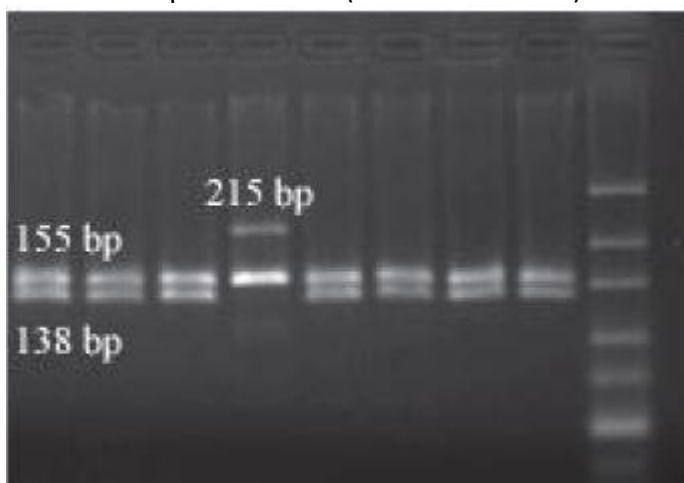
**Barva-a1-R** 5'-TGGTGTGGATCATTGTTGG-3'

Annelační teplota = 50 °C

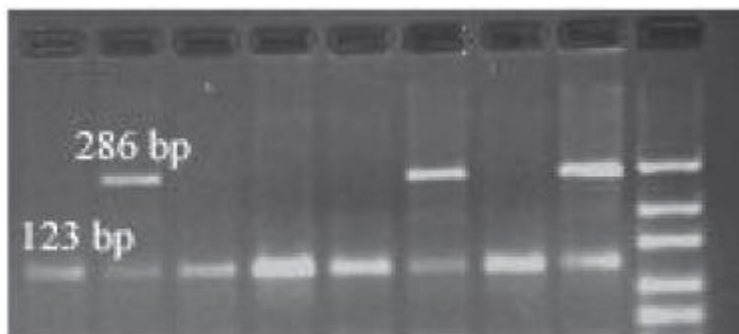
**Barva-a2-F** 5'-ATTACATCAGTACCAAAACAGGC-3'

**Barva-a2-R** 5'-TCGTAAACAATGGTGGTGCT-3'

Annelační teplota = 50 °C (Vávra et al. 2015).



Obrázek 24: Vzorový elektroforeogram markeru BC266-STS (Barva-a1) (Vávra et al. 2015)



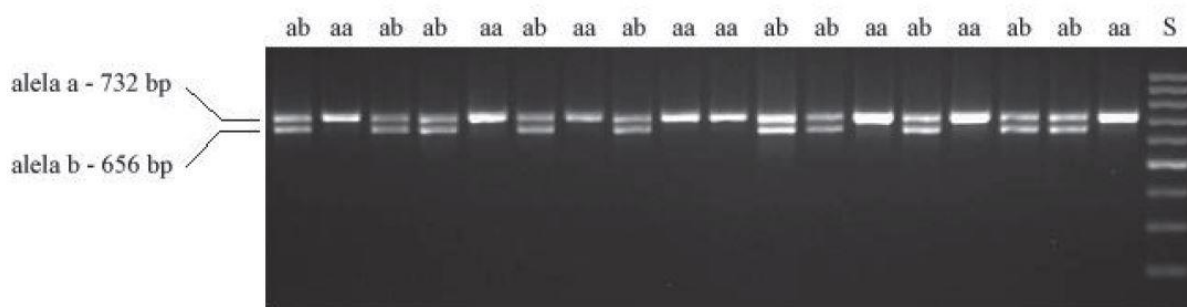
Obrázek 25: Vzorový elektroforeogram markeru BC266-STS (Barva-a2) (Vávra et al. 2015)

Lokus *MdMYBA* může nést dvě alely. Alelu, která je nemutovaná a je spojena s červenou barvou slupky, alelu, která má mutaci v podobě delece a je spojena se žlutou barvou slupky. Expres transkripčního faktoru *MdMYBA* je mnohem intenzivnější u odrůd s výraznou červenou barvou slupky a je rovněž pozitivně ovlivněna nižšími teplotami a dopadem UV-B záření, což jsou všeobecně známé faktory vedoucí k výraznějšímu vybarvování plodů jabloní (Ban et al. 2007). Vávra et al. (2015) uvádí, že pro detekci genotypů s červeně zbarvenou slupkou byl navržen kodominantní PCR marker. Pomocí navržených primerů dochází k amplifikaci dvou fragmentů. Nemutovanou alelu, charakterizující červenou barvu slupky, definuje fragment o délce 732 bp. Mutovanou alelu, charakterizující žlutou barvu slupky, definuje fragment od délce 656 bp.

**MdMYBA-F** 5'-ATTCTAGGTGTCTTTCTGGAGTGTA-3'

**MdMYBA-R** 5'-AGGTCCAATTTCCGTACAATG-3'

Annelační teplota = 63,5 °C.



Obrázek 26: Vzorový elektroforeogram kodominantního markeru *MdMYBA* (Vávra et al. 2015)

### 3.5.2 Barva dužniny

Molekulární markerování lze využít i pro včasnou determinaci jedinců s červeně zbarvenou dužninou plodů, za kterou jsou zodpovědná barviva antokyany. Regulátorem exprese genů biosyntetické dráhy antokyanů je MYB-třída transkripčních faktorů (Ban et al. 2007). U jabloně Chagné et al. (2007) identifikoval transkripční faktor *MdMYB10*, který je ve vazbě s *Rni* lokusem. Ten je zodpovědný za červené zbarvení jak slupky, tak dužniny. Pomocí PCR markeru je detekovatelná dominantní alela *MdMYB10* genu. Typickým donorem alely zodpovědné za červené zbarvení dužniny je *M. robusta*, odrůdy s výrazně červenou dužninou jsou odvozeny od botanického druhu *M. pumila* var. *niedzwetzkyana* (Dvořák et al. 1976), u ní jsou však s červeným zbarvením dužniny spojené některé nežádoucí vlastnosti jako je malá velikost plodů, rychle měknoucí dužnina a trpká chuť.

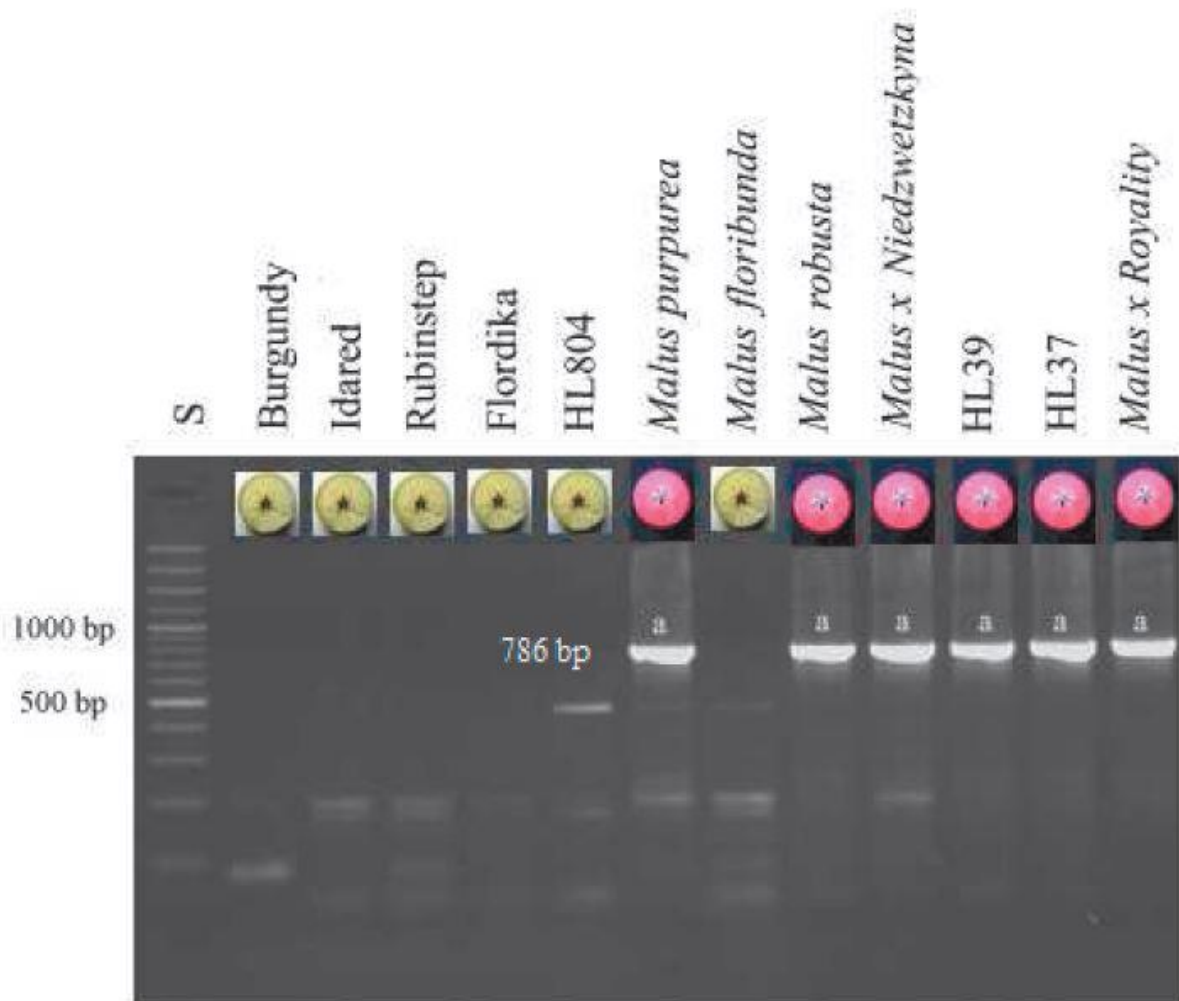
Primery využitě na amplifikaci markeru *MdMYB10*:

**MdMYB10-F** 5'-CGAGTGCTAATAGCAACC-3'

**MdMYB10-R**      **5'-CCTCTGTTGGCCGAATACAC-3'**

Délka markerujícího fragmentu je 786 bp, annelační teplota 55,7 °C (Chagné et al. 2007).

Vávra et al. (2015) porovnával níže uvedené odrůdy na přítomnost dominantní alely, výsledkem je vzorový elektroforeogram uvedený na obrázku č.27.



Obrázek 27: Elektroforeogram dom. markeru MdMYB10. Upraveno podle Vávra et al. (2015)

### 3.6 Skladování

#### 3.6.1 Etylen

Zoufalá et al. (2009) považuje za rozhodující kritérium pro délku skladovatelnosti jablek měknutí dužniny. Klíčovým regulátorem procesu zrání jablek je etylen. U některých odrůd je produkce etylenu během skladování výrazně menší. Takové plody pak mohou být při správné teplotě skladovány až jeden rok, aniž by docházelo ke snížení jejich kvalitativních parametrů.

Na měknutí dužniny se ve velké míře podílí fytohormon etylen, který je u vyšších rostlin syntetizován dvěma enzymaticky katalyzovanými kroky. Prekurzorem etylenu je S-adenosyl-L-methionin (SAM). V první fázi ACC-syntáza (ACS) cykлизuje SAM na 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinu (ACC). Ve druhé fázi dochází působením ACC-oxidázy (ACO) k oxidativní přeměně ACC na etylen (Kende 1993). Tvorba ACS je u jabloní řízena lokusem *Md-ACS1*, který může nést dvě alely, a to původní s normální transkripční aktivitou a mutovanou (s insercí v promotoru) s nízkou transkripční aktivitou (Sunako et al. 1999). Costa et al. (2005) popisuje, že

tvorbu ACO je řídí lokus *Md-ACO1*. Ten může nést dvě alely, u jedné z alel došlo k delecii v promotorové oblasti genu. Tato mutovaná alela také zodpovídá za sníženou tvorbu etylenu. Pro včasné určení jedinců, kteří budou mít plody s pomalým měknutím dužniny je podstatná detekce mutovaných alel pomocí molekulárních markerů (Vávra et al. 2015).

### 3.6.2 Molekulární markery genů *Md-ACO1* a *Md-ACS1* ovlivňujících měknutí plodů jablek

U genu *Md-ACS1*, který je zodpovědný za biosyntézu ACC-syntázy, byla nalezena variabilita v promotorové oblasti. Alela nesoucí inzerci v promotoru byla označena jako *Md-ACS1-2* a je zodpovědná za výrazně sníženou transkripční aktivitu tohoto genu. Odrůdy s homozygotní sestavou alel *Md-ACS1-2* produkují jen velmi malé množství etylénu v porovnání s odrůdami s homozygotní sestavou původní alely *Md-ACS1-1*, která má normální transkripční aktivitu (Vávra et al. 2015).

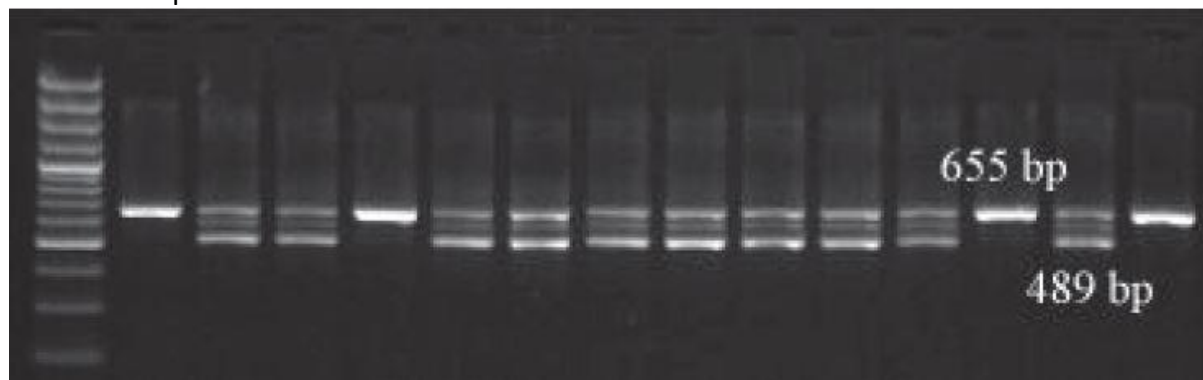
Alela *Md-ACS1-1* s normální transkripční aktivitou je charakterizována přítomností fragmentu o velikosti 489 bp. Alela *Md-ACS1-2* s omezenou transkripční aktivitou a nízkou produkcí etylénu je určena přítomností fragmentu o velikosti 655 bp (Zoufalá et al. 2009).

Vávra et al. (2015) dále uvádí, že při amplifikaci dochází k vytváření nespecifického fragmentu o velikosti kolem 590 bp, který ale nemá žádný vliv na detekci markerujících fragmentů.

Primery použité k amplifikaci kodominantního markeru Md-ASC1CZU:

**ACS1-5'F**                    **5'-AGAGAGATGCCATTTTTGTTTCGTAC-3'**  
**ACS1-5'R**                    **5'-CCTACAAACTTGCGTGGGGATTATAAGTGT-3'**

Annelační teplota = 60 °C.



Obrázek 28: Vzorový elektroforeogram Md-ASC1-CZU. Zdroj (Vávra et al. 2015)

I u genu *Md-ACO1*, který řídí syntézu ACC-oxidázy, byla charakterizována variabilita v promotorové oblasti. Alela nesoucí tuto delecii byla označena jako *Md-ACO1-1* a byla rovněž zodpovědná za sníženou produkci etylénu. Na měknutí plodů spolupůsobí oba hodnocené geny *ACS1* i *ACO1* a statisticky bylo potvrzeno, že mutace genu *Md-ACS1* působí na snížení produkce etylénu výrazně intenzivněji oproti mutaci genu *Md-ACO1*. Pro selekci genotypů s předpokládanou sníženou produkcí etylénu byly navrženy PCR markery detekující inzerci v lokusu *Md-ACS1* a delecii v lokusu *Md-ACO1*. V hodnocených genotypech se můžou vyskytovat různé kombinace obou těchto markerů. Například obě kauzální mutace v lokusech *Md-ACO1* i *Md-ACS1* byly detekovány u odrůdy 'Fuji', pro kterou je typické pomalé měknutí plodů. Homozygotní sestava mutované alely pouze v lokusu *Md-ACO1* byla detekována u odrůd 'Meteor' a 'Red Delicious'. Homozygotní sestava mutované alely pouze v lokusu *Md-ACS1* byla detekována u odrůd 'Gala', 'Gloster', 'Gold Bohemia', 'Melrose', 'Rubín', 'Rubinstep' a 'Rucla' (Vávra et al. 2015).

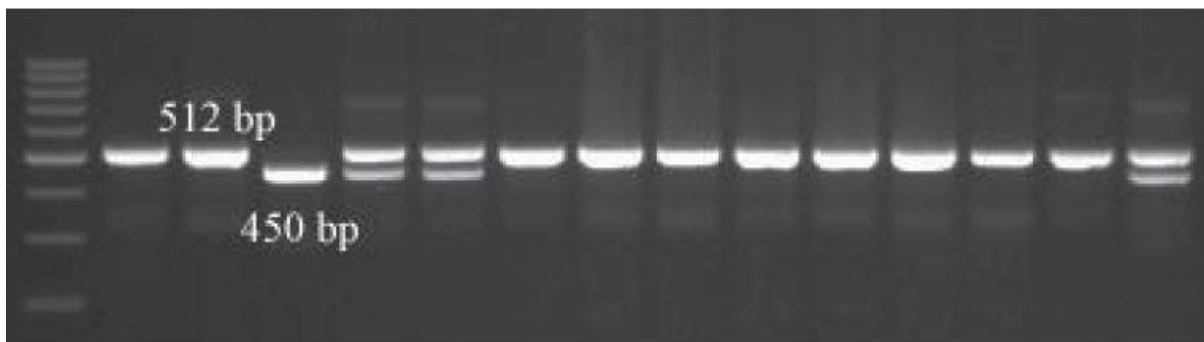
Alela s normální transkripční aktivitou je charakterizována přítomností fragmentu o velikosti 512 bp, mutovaná alela s omezenou transkripční aktivitou je určena přítomností fragmentu o velikosti 450 bp.

Primery použité k amplifikaci markeru Md-ACO1-CZU:

**CZU-ACO1-F**            5'-CCAGTTACCCGACTACCCATT-3'

**CZU-ACO1-R**            5'-TTCAAATCTTGGCTCCTTGG-3'

Annelační teplota 63,4 °C



Obrázek 29: Vzorový elektroforeogram kodominantního markeru Md-ACO1-CZU. Zdroj (Vávra et al. 2015)

### 3.7 Alergeny

V jablkách byly doposud zdokumentovány čtyři hlavní třídy alergenů. Označují se jako *Mal d1*, *Mal d2*, *Mal d3* a *Mal d4*. Breiteneder & Radauer (2004) popisují, že všechny tyto alergeny jsou seskupeny v multigenových rodinách. Alergeny *Mal d* 1-3 jsou součástí skupiny tzv. PR-Proteinů. (Paghogenesis-Related Proteins). Tyto proteiny jsou součástí obranného systému rostlin při napadení některými patogeny jako jsou houby, viry, bakterie, nebo se tvoří v reakci na nepříznivé podmínky prostředí. Hsieh et al. (1995) uvádí, že množství alergenů v plodech je ovlivněno např. odrůdou, působením stresu, nebo podmínkami skladování. Záleží tak především na expresi jednotlivých genů. Z těchto důvodů se množství alergenů může výrazně lišit v rámci jedné odrůdy, tak i v rámci ročníků u jednotlivých stromů. Nejvyšší hodnoty alergenů byly prokázány ve slupkách plodů. Vzorky k analýzám se odebírají z nich. Rozdíl oproti využití klasických PCR markerů je v tom, že qRT-PCR pracuje s RNA.

Prvním krokem je **izolace RNA**. Udvardi et al. (2008) uvádí, že RNA je na rozdíl od DNA nestabilní. Proto je jí nutné po odebrání vzorku zmrazit kapalným dusíkem a dále uchovávat při teplotě -80 °C.

Druhým krokem je **Reverzní transkripce**. Jedná se o přepis RNA do cDNA (komplementární DNA) za použití enzymu reverzní transkriptázy. Takto připravený materiál je možné amplifikovat pomocí qRT-PCR.

K analýzám genové exprese se využívá Real-Time PCR kvantifikace. Určení míry genové exprese může být provedeno dvěma způsoby – relativní, nebo absolutní kvantifikací. Častěji je využívána relativní kvantifikace. Schmittgen & Livak (2008) popisují jednotlivé způsoby:

**Absolutní kvantifikace** – Absolutní kvantifikace určuje výchozí počet molekul templátové DNA a srovnává se standardy o známých koncentracích. Při tomto způsobu kvantifikace se využívají kalibrační křivky standardů, ze kterých lze po porovnání hodnot Cq odečíst koncentrace neznámého vzorku.

**Relativní kvantifikace** – Relativní kvantifikací jsou zjišťovány změny v množství mRNA testovaného genu v porovnání s referenčním genem. Nejčastěji se jako referenční geny využívají

„house keepingové“ geny, které by měly mít stálou úroveň genové exprese u všech typů pozorovaných vzorků. „House keepingové“ geny jsou totiž nezbytné pro udržení základních funkcí buňky a z toho důvodu by se měly neustále exprimovat. Často se při relativní kvantifikaci jako referenční gen využívá aktin. Pagliarani et al. (2013) vyvinul následující primery k amplifikaci genů v qRT-PCR. (ve směru 5´-3´)

*Mal d 1.02*

**qMd1.01/02F**            **GATTGAAGGAGATGCTTTGACA**

**qMd1.02R**             **TTGGTGTGGTAGTGGCTGATA**

Annelační teplota = 61°C

*Mal d 4.01*

**Md401fw**             **CAGCCAGGCCCTGTTAATC**

**Md401rv**             **AGAGACCCTGCTCAATAAGGTAA**

Annelační teplota = 61°C

*Mal d 4.02*

**qMd402F**             **GTGTTACTGTCAAGAAGAGCACAA**

**qMd402R**             **GCTCAATGAGATAATCCGCA**

Annelační teplota = 61°C

*Mal d 4.03*

**Md403fw**             **GGCCAAGCTTTGGTTTTTC**

**Md403rv**             **GCCTTGATCAATCAGGTAGTCT**

Annelační teplota = 61°C

*Mal d 4.04*

**Md404Afor**           **GGCAAGCTCTAGTATTTGGAATCTAC**

**Md404Arev**           **TCGCCAACCTCTCAACC**

Annelační teplota = 61°C

*PLA21*

**PLA 21-For**           **ATCGCACGACACAGTTCTCC**

**PLA 21-Rev**           **TATTGTCCGGAACAGTGGGCG**

Annelační teplota = 61°C

*PLA23*

**PLA 23-For**           **AGTGCAGCCAAACGTTCCCTA**

**PLA 23-Rev**           **CAGCCTCCATGACAAGGGTT**

Annelační teplota = 61°C

*TGase*

**TGaseRTF**           **AGGGATCAAGCTGGCATCTG**

**TGaseRTR**           **AAGCATTTGCGAGGAAACCTT**

Annelační teplota = 61°C

*Aktin 7*

**actin F**             **CTATGTTCCCTGGTATTGCAGACC**

**actin R**             **GCCACAACCTTGATTTTCATGC**

Annelační teplota = 61°C



### 3.8 Šlechtění na odlišné růstové typy

Blažek (2001) dělí jabloně podle parametrů do čtyř skupin. Bere v potaz intenzitu růstu, charakter plodnosti, hustotu rozvětvení, délku internodií nebo sklony k vyholování. Praktické využití MAS (Marker Assisted Selection) připadá v úvahu pro detekci dalšího růstového typu – CATS (Columnar Apple Trees), tedy jabloní se sloupcovým růstem. Tian et al. (2005) uvádí, že sloupcový růst u jabloní je řízen dominantní alelou *Co*, donorem genu je mutant odrůdy 'McIntosh' pojmenované 'McIntosh Wijcik'. Mutaci charakterizuje redukovaný počet laterálních výhonů, zvýšený počet plodonožů a kompaktní internodia. Tato charakteristika dělá ze sloupcových jabloní důležitý genetický zdroj pro další šlechtění a produkci kompaktních kultivarů.

(Tian et al. 2005) dále popisuje, že dominantní alela *Co* vznikla samovolně zpětnou mutací. Všechny doposud známé odrůdy se sloupcovým růstem jsou v genu *Co* heterozygotní.

Rozpoznat sloupcový růst u hybridních semenáčků je velmi obtížné, proto je pro provedení včasné a přesné selekce velmi vhodné využít molekulární marker. Problémem však zůstává, že molekulární markery pro sloupcový růst jsou vazbové (nejsou přímo v genu, jsou s ním jen ve vazbě) a je možná jejich rekombinace (výskyt markerů u genotypů s normálním růstem nebo naopak absence markerů u genotypů se sloupcovým růstem). Před aplikací těchto markerů je tedy nezbytné vyloučit možnost výskytu kombinací markerujících alel s nemutovanou recesivní alelou *co*. (Vávra et al. 2015)

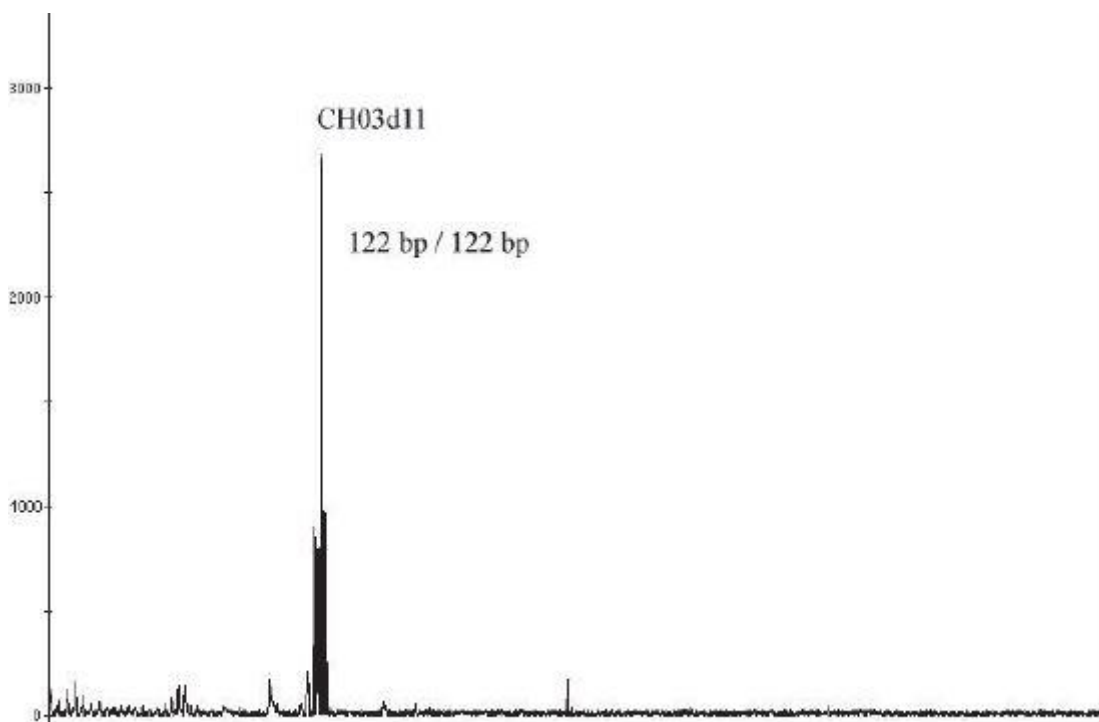
Pro praktickou selekci na sloupcový růst jabloní jsou dobře využitelné dva vazbové markery a to SSR marker CH03d11 a marker SCAR287.

#### Marker CH03d11:

Markeru CH03d11 má kodominantní charakter. Markerující alela 172 bp, nemarkerující 114 bp, 118 bp.

**CH03d11-F**                    **ACCCACAGAAACCTTCTCC**  
**CH03d11-R**                    **CAACTGCAAGAATCGCAGAG**

Annelační teplota = 62°C



Obrázek 30: Vzorový chromatogram markeru CH03d11. Zdroj (Vávra et al. 2015)

### Marker SCAR287:

Tento marker odvodil od původního markeru SCAR682 Tian et al. (2005). U markeru se ale vyskytovaly nespecifické amplifikace. Nově navržený dominantní marker SCAR287 je jednoduše detekovatelný pomocí elektroforézy. Přítomnost dominantní alely Co je charakterizována přítomností fragmentu o velikosti 287 bp.

Primery použité pro amplifikaci markeru SCAR278

**SCAR287-F** 5'-CGTTAAGTAACACTGCACGATGA-3'

**SCAR287-R** 5'-CCGCTGGAGAACAATAATCA-3'

Annelační teplota = 59°C

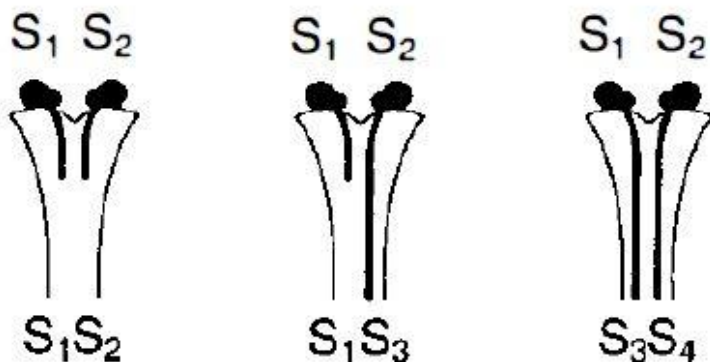
### 3.9 Hodnocení opylovacích poměrů

Veškeré jabloně vykazují gametofytickou autoinkompatibilitu, která jim znemožňuje samoopylení nebo oplození geneticky podobným pylem. Autoinkompatibilita je řízena sérií polymorfních S-alel. S-gen je zodpovědný za produkci rodiny ribonukleáz v pestíku. Tyto S-RNázy specificky interagují s doposud neznámým genem umístěným na S-lokusu a působí jako inhibitor opylení (Broothaerts 2002). Vejl et al. (2005) definuje inkompatibilitu jako neschopnost rostlin s funkčními gametami vytvářet semena. Inkompatibilita se týká jak samoopylení, tak i cizosprášení s geneticky příbuznými rostlinami.

Autoinkompatibilní reakce je založena na tvorbě specifických enzymů S-RNáz, které syntetizují buňky pestíku. Syntéza je vyvolaná typem haploidního pylového zrna, ze kterého má vyklíčit pylová láčka. Geneticky je inkompatibilní reakce řízena sérií S-alel, které se nacházejí vždy v jedné kopii v pylovém zrně (Broothaerts et al. 1995)

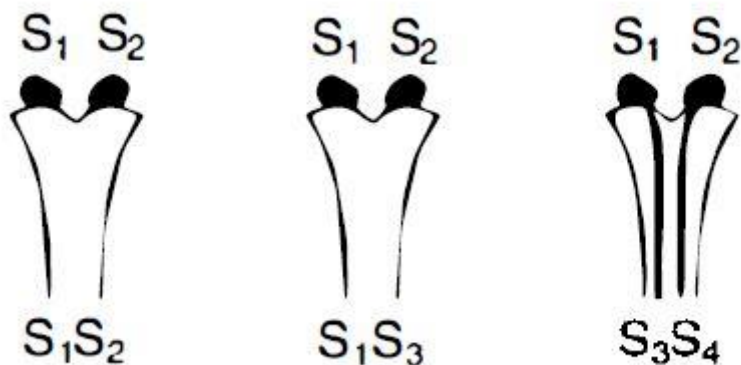
Clarke & Newbiggin (1993) rozdělují inkompatibilitu na sporofytickou a gametofytickou.

**Gametofytická inkompatibilita** umožňuje opylení, pokud se liší alespoň jedna gameta. Varianty znázorňuje následující obrázek.



Obrázek 31: Gametofytická inkompatibilita. Zdroj (Clarke & Newbiggin 1993)

**Sporofytická inkompatibilita** umožňuje opylení jen v případě, že se liší všechny gamety. Princip je znázorněn na dalším obrázku.



Obrázek 32: Sporofytická inkompatibilita. Zdroj Clarke & Newbiggin (1993)

Pro rod *Malus* je charakteristická jednolokusová gametofytická inkompatibilita. Tento typ inkompatibility je charakteristický vzájemným působením haploidního genomu každého pylového zrna a diploidního genomu pletiva pestíku (Vejl et al. 2005).

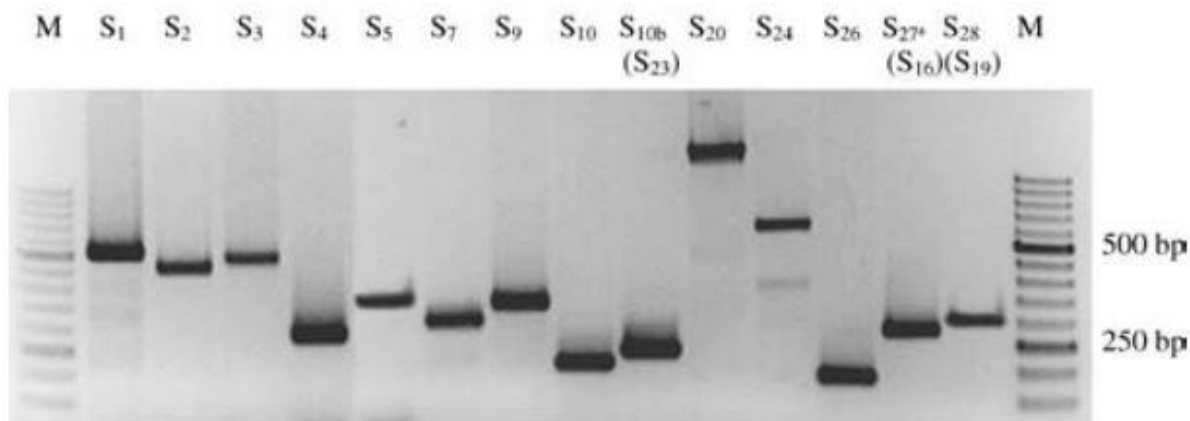
Blažek (2001) uvádí, že pokud při výsadbě kombinujeme menší počet odrůd, je dobré znát jejich kompatibilitu. Tím se vyhneme riziku neplodnosti některé z odrůd. Přesná znalost jednotlivých S-genotypů je významná především v produkčních sadech.

Broothaerts (2002) zpracoval sekvence primerů pro známe S-alely. Jednalo se o alely S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>5</sub>, S<sub>7</sub>, S<sub>9</sub>, S<sub>10</sub>, S<sub>16</sub>, S<sub>19</sub>, S<sub>22</sub>, S<sub>23</sub> a S<sub>24</sub>. Složení PCR reakce a její teplotně časový profil optimalizovali Melounová et al. (2005). Jejich přehled uvádím v následující tabulce.

Tabulka 6: Sekvence primeru pro analýzu S-alel. Zdroj (Broothaerts 2002)

S-alela:	Primer:	Sekvence 5'-3'	PCR program	Velikost fragmentů (bp)
S <sub>1</sub>	FTC168 FTC169	ATATTGTAAGGCACCGCCATATCAT GGTCTGTATTGGGGAAGACGCACAA	Standard	+/-530
S <sub>2</sub>	OWB122 OWB123	GTTCAAACGTGACTTATGCG GGTTTGGTTCCTTACCATGG	Standard	449
S <sub>3</sub>	FTC177 FTC226	CAAACGATAACAAATCTTAC TATATGGAAATCACCATTTCG	A 57 °C	500
S <sub>4</sub>	FTC5 OWB249	TCCCACAATACAGAACGAGA CAATCTATGAAATGTGCTCTG	Standard, <i>TaqI</i>	274 (197+77)
S <sub>5</sub>	FTC10 FTC11	CAAACATGGCACCTGTGGGTCTCC TAATAATGGATATCATTGGTAGG	Standard	346
S <sub>6</sub> <sup>b</sup>	FTC141 FTC142	ATCAGCCGGCTGTCTGCCACTC AGCCGTGCTCTTAATACTGAATAC	E 45 sec	+/-850
S <sub>7</sub>	FTC143 FTC144	ACTCGAATGGACATGACCCAGT TGTCGTTTCATTATTGTGGGATGTC	Standard	302
S <sub>9</sub>	FTC154 FTC155	CAGCCGGCTGTCTGCCACTT CGGTTCGATCGAGTACGTTG	Standard	343
S <sub>10</sub>	FTC12 FTC228	CCAAACGTACTCAATCGAAG ATGTCGTCCCCTGTCTGAATC	Standard	209
"S <sub>10b</sub> " (S <sub>23</sub> )	FTC222 FTC224	CAATCGAACCAATCATTGGT GGTGTTCATATTGTTGGTACTAATG	Standard	237
S <sub>20</sub>	FTC141 FTC142	ATCAGCCGGCTGTCTGCCACTC AGCCGTGCTCTTAATACTGAATAC	E 45 sec, <i>NarI</i>	+/-920 (800+120)
S <sub>24</sub>	FTC231 FTC232	AAATATTGCAACGCACAGCA TTGAGAGGATTCAGAGATG	Standard	+/-580
S <sub>26</sub>	FTC14 FTC9	GAAGATGCCATACGCAATGG TTAATACCGAATATTGGCG	A 55 °C	194
S <sub>27a</sub> (S <sub>16</sub> )	FTC5 OWB249	TCCCACAATACAGAACGAGA CAATCTATGAAATGTGCTCTG	Standard, <i>TaqI</i>	274 (243+31)
S <sub>27b</sub> (S <sub>22</sub> )	FTC5 OWB249	TCCCACAATACAGAACGAGA CAATCTATGAAATGTGCTCTG	Standard, <i>TaqI</i>	274 (199+31+44)
S <sub>28</sub> (S <sub>19</sub> )	FTC229 FTC230	TCTGGGAAAAGAGAGTGGCTC TTTATGAACTTCGTTAAGTCTC	Standard	304
S <sub>14/17/21</sub> <sup>b</sup>	FTC141 FTC142	ATCAGCCGGCTGTCTGCCACTC AGCCGTGCTCTTAATACTGAATAC	E 45 sec, <i>NarI</i>	+/-920 (920)

Dále přikládám vzorový elektroforeogram s analýzou jednotlivých S-alel.



Obrázek 33: Vzorový elektroforeogram. Zdroj (Broothaerts 2002)

### 3.10 Využití MAS v ČR a ve světě

MAS (Marker Assisted Selection) je součástí šlechtitelských postupů renomovaných šlechtitelských stanic u nás i ve světě. Pro srovnání uvádím dvě české šlechtitelské stanice, jednu německou a jednu francouzskou.

#### 3.10.1 Insitut für Züchtungsforschung an Obst des JKI (Julius Kühn-Insitut), Dresden-Pillnitz

Flachowsky et al. (2017) konstatuje, že směry v novošlechtění jabloní určují z velké části preference zákazníků. Na trhu je několik málo odrůd označovaných jako Allround. Jsou to jablka, která si můžete koupit během celého roku, nehledě na sezónu a většinou se dovážejí z druhého konce světa. Největším přínosem odrůd vyšlechtěných v Pillnitzkém institutu je skvělá kvalita a blízkost ke spotřebiteli. Sezónní jablka z regionu získávají v posledních letech stále větší atraktivitu pro spotřebitele a tím napomáhají k rozvoji lokálního trhu. Pillnitzké odrůdy jsou vhodné jak pro malopěstitele, tak pro velkokapacitní ovocné sady i pro režim ekologického hospodaření. To je možné díky vyšlechtěným rezistencím proti biotickým i abiotickým faktorům. Některé odrůdy nesou geny rezistencí proti více faktorům, nebo více genů proti jednotlivým faktorům. Tím je zajištěna bezpečnost proti prolomení monogenní rezistence. Základem je pyramidizace rezistencí klasickým křížením. Při vzniku nových odrůd hrají významnou roli genetické analýzy, které umožňují výrazné zrychlení procesu šlechtění. Zejména u jabloní hraje selekce pomocí genetických analýz nezastupitelnou roli. V programu na rezistentní šlechtění získali s pomocí MAS řadu klonů držících geny rezistence z různých zdrojů, mimo jiné z divokých jabloní. Dvě zajímavé odrůdy jsou prezentovány na následujících obrázcích.

# PiCol1

Die Säule aus Pillnitz

 'Pinova' x 'Tuscan'

 A. Peil, C. Fischer

 seit 2016

 Bundesrepublik Deutschland  
Julius Kühn-Institut (JKI),  
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen

 JKJ, Institut für Züchtungsforschung an Obst,  
Dresden-Pillnitz



Obrázek 34: Odrůda PiCol1 se sloupovitým růstem, rezistencí proti padlí, citlivá vůči strupovitosti. (Flachowsky et al. 2017).

# Klon PiRo1

Rot, rot rot

 'Idared' x *Malus pumila* Niedzwetzkyana

 A. Peil

 Zuchtklon, noch kein Sortenschutz

 -

 JKJ, Institut für Züchtungsforschung an Obst,  
Dresden-Pillnitz



Obrázek 35: Odrůda PiRo1, první vyšlechtěná odrůda s červenou dužninou (Flachowsky et al. 2017).



Obrázek 36: Odrůda PiRo1 (Flachowsky et al. 2017).

### 3.10.2 INRA

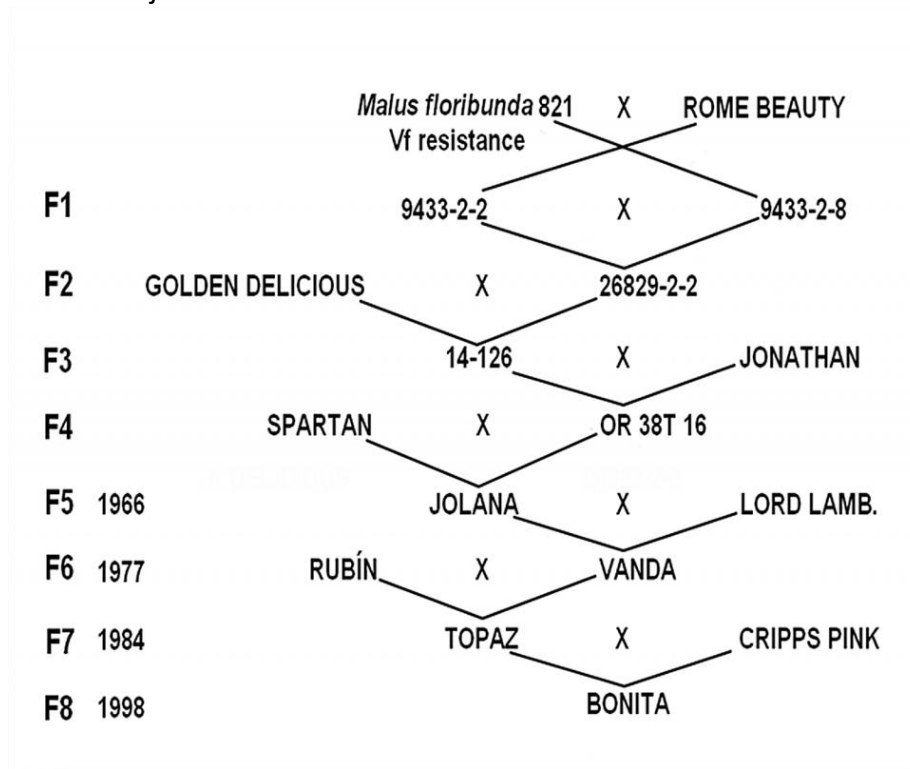
Francouzský program šlechtění jabloní INRA odstartoval v roce 1960. Hlavním zaměřením, jak uvádějí Laurens & Pitiot (2003) je kombinace vlastností jabloní – vysoké kvality plodů, rezistence vůči chorobám a škůdcům a dosahování vysoké a pravidelné sklizně. Každoročně je vypěstováno mezi 10 a 20 tisíci semenáčky. Ty jsou inokulovány typy strupovitosti získané v sadech INRA. Jedinci, kteří vykazují rezistenci nebo toleranci vůči strupovitosti, jsou pěstováni ve školkách a dále testováni na odolnost vůči padlí. Jedinci rezistentní vůči oběma chorobám se dále prověřují na kvalitu plodů. Nejlepší z nich se stávají základem nových odrůd. Velikost a design experimentálních sadů poskytuje každoročně velké množství dat, která umožňují studovat metodologické aspekty a genetické parametry. INRA sdílí vědecké poznatky týkající se genetické diverzity, managementu rezistencí nebo kvality ovoce s pěstiteli. Ti tak mají dostatek informací a podporu při vývoji nových odrůd.

### 3.10.3 Ústav experimentální botaniky AV ČR

Činnost stanice je zaměřena na šlechtění rezistentních odrůd jabloně k chorobám, zejména k padlí jabloňovému (*Podosphaera leucotricha*) a ke strupovitosti (*Venturia inaequalis*), nejzávažnějšímu onemocnění jabloně. Program šlechtění byl na stanici zahájen v roce 1966 a využívá genetické zdroje rezistence ke strupovitosti podmíněnou genem *Vf* z planého druhu *Malus floribunda* a vybrané odrůdy s polygenní tolerancí ke strupovitosti a k padlí. Odrůdy vyšlechtěné v rámci tohoto programu jsou právně chráněny národním šlechtitelským osvědčením. Současný výzkum je zaměřen na další zlepšování hospodářských vlastností

rezistentních odrůd a na posílení rezistence ke strupovitosti kombinací rezistence Vf s tolerancí na polygenním základě.

Na stanici jsou rovněž šlechtěny odrůdy rezistentní k chorobám s kompaktním sloupovitým růstem s využitím odrůd odvozených z mutace "Wijcik" odrůdy McIntosh. Jak uvádí Kolář (2019), zaměřují se v Ústavu experimentální botaniky AV ČR na hledání, genetickou analýzu a šlechtitelské uplatnění stabilní rezistence proti strupovitosti. Kombinují přitom jednogennou (monogenní) odolnost s jiným typem odolnosti, založeným na souhře více genů (polygenní odolnost). Dobrý příklad šlechtitelského postupu je proces šlechtění odrůdy Bonita, znázorněný na následujícím obrázku.



Obrázek 37: Šlechtění odrůdy Bonita (Kolář 2019)

### 3.10.4 Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy

VŠUO Holovousy se zabývá výzkumem problematiky ovocnářství a šlechtěním ovocných plodin kontinuálně více než šest desetiletí. Výzkumná činnost ústavu se prakticky týká všech ovocných plodin, které se pěstují na území České republiky jako tržní kultury. VŠUO Holovousy vyšlechtil a registroval více než 75 odrůd jablek, švestek, třešní a meruněk. Šlechtění je zaměřeno na tržní kvalitu a odolnost k abiotickým a biotickým stresům, nebo šlechtění sloupovitých odrůd jablek rezistentních vůči strupovitosti. Do procesu šlechtění byly zařazeny molekulární metody – selekce novošlechtění v raných fázích vývoje rostlin za využití genetických markerů (Marker Assisted Selection – MAS). Jako příklad úspěšně registrované odrůdy vyšlechtěné v VŠUO Holovousy uvádím odrůdu Rosabel viz následující obrázek.



Obrázek 38: Rosabel. Zroj (www.vsuo.cz)

## 4 Závěr

Poznatky, které byly získány na základě studia vědecké a odborné literatury je možné shrnout do následujících bodů:

- S využitím základní a doporučené literatury byla vypracována literární rešerše na téma „Molekulární markery a jejich využití ve šlechtění odrůd jablek“. Z rešerše vyplývá, že markerovány jsou ty oblasti genomu, které jsou pro šlechtitele důležité, mají přímý vztah k hospodářsky významným vlastnostem rostliny a plodů. Technologii MAS tak využívají především šlechtitelé a pěstitelé ve velkokapacitních sadech. Podstatou šlechtění jablek je vhodný výběr rodičovských rostlin, jejich zkřížení a následné dopěstování a výběr hybridních semenáčků. Jedinci náchylní ke strupovitosti jsou vyřazeni během první fáze – inokulace patogenem *Venturia inaequalis*. Následuje hodnocení ve výsadbě a polních podmínkách na stanovišti. Tento proces trvá několik vegetačních období. Výběr semenáčků s požadovanými vlastnostmi je možné urychlit ověřením přítomnosti dominantních sestav žádaných genů pomocí MAS. Vzhledem k tomu, že je detekce molekulárních markerů nedestruktivní a je možné i provádět již ve fázi několika listů, jedná se o časovou úsporu několika let.
- Byla popsána taxonomie jablek, jejich původ, historie šíření a vývoj základních vlastností plodů.
- Molekulární markery jsou založeny na jednotlivých metodách detekce. RFLP – polymorfismus délky restrikčních fragmentů. Využívá se převážně k odlišení jedinců v populaci. PCR – polymerázová řetězová reakce je založena na amplifikaci segmentů DNA



za pomoci známých primerů. Jedná se o markery kodominantní nebo dominantní. PCR je v současnosti nejvyužívanější metoda. RAPD – metoda náhodně amplifikované polymorfní DNA je dominantní marker. Dále se využívají metody AFLP – délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů, PCR-RFLP – kombinace předchozích markerů, SNP – polymorfismus jednoho nukleotidu, Polymorfismus mikrosatelitů a způsob jejich vzniku pomocí Stepwise Mutation Modelu, který je velmi podobný vzniku délkového polymorfismu kodominantních markerů, tedy substitucí, adicí nebo delecí části genu nebo jeho okolí.

- Podrobně byla popsána metoda PCR. Za objev PCR obdržel americký biochemik Kary Mullis Nobelovu cenu. Zpřístupnění metody PCR znamenalo revoluci v rozšíření využívání molekulárních markerů.
- Základem rezistenčního šlechtění je teorie gen proti genu, která je podstatou monogenní dědičnosti. Cílem rezistenčního šlechtění je tzv. pyramidizace, kdy je genom záměrnou hybridizací doplňován o další žádané geny rezistencí. Jelikož donory bývají nejčastěji divoké nebo okrasné jabloně s nekvalitním ovocem, využívá se metoda zpětného nasycovacího křížení.
- Geny rezistence vůči strupovitosti jsou označeny jako *Rvi1-18*
- Gen rezistence vůči padlí je označený jako *PL1C*
- Jednou ze zákazníků nepreferovanějších vlastností jablek je barva slupky. Ta je řízena genem *MdMYBA*. Barvu dužniny řídí gen *MdMYB10*.
- Sloupcový růst u jabloní je řízen dominantní alelou *Co*, donorem genu je mutant odrůdy 'McIntosh' pojmenované 'McIntosh Wijcik'. Mutaci charakterizuje redukovaný počet laterálních výhonů, zvýšený počet plodonožů a kompaktní internodia.
- Veškeré jabloně vykazují gametofytickou autoinkompatibilitu, která jim znemožňuje samoopylení nebo oplození geneticky podobným pylem. Autoinkompatibilita je řízena sérií polymorfních *S*-alel. *S*-gen je zodpovědný za produkci rodiny ribonukleáz v pestíku.
- Samostatnou kapitolou je detekce přítomnosti alergenů. V jablkách byly doposud zdokumentovány čtyři hlavní třídy alergenů. Označují se jako *Mal d1*, *Mal d2*, *Mal d3* a *Mal d4*. Základním rozdílem oproti předchozím markerům je to, že množství alergenů je možné měřit až ze zralých plodů a k detekci se využívá zpětná transkripce RNA.

## 5 Literatura

- Agrios G. 2004. Plant pathology: Fifth edition. Page Plant Pathology: Fifth Edition.
- Ban Y, Honda C, Hatsuyama Y, Igarashi M, Bessho H, Moriguchi T. 2007. Isolation and Functional Analysis of a MYB Transcription Factor Gene that is a Key Regulator for the Development of Red Coloration in Apple Skin. *Plant Cell Physiology* **48**:958–970.
- Bhargava A, Fuentes FF. 2010, March. Mutational dynamics of microsatellites.
- Binard P (World A and PA (WAPA)). 2018. European Union - Apple crop 2018/2019. Available from [www.prognosfruit.eu](http://www.prognosfruit.eu).
- Blažek J. 2001. Pěstujeme jabloně. Brázda, Praha.
- Breiteneder H, Radauer C. 2004. A classification of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **113**:821–830.
- Broothaerts W. 2002. New findings in apple S-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some S-alleles. *Theoretical and Applied Genetics* **106**:703–714.
- Broothaerts W, Janssens GA, Proost P, Broekaert WF. 1995. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Molecular Biology* **27**:499–511.
- Brown T. 2010. Gene cloning & DNA analysis - an introduction. T.A.Brown.
- Buchtová I. 2018. Situační a výhledová zpráva - Ovoce. Praha.
- Chagné D et al. 2007. Mapping a candidate gene (MdMYB10) for red flesh and foliage colour in apple. *BMC genomics* (**8**):212.
- Cheng FS, Weeden NF, Brown SK. 1996. Identification of co-dominant RAPD markers tightly linked to fruit skin color in apple. *Theoretical and Applied Genetics* **93**:222–227.
- Clark D. 2005. Molecular biology. Elsevier Academic Press, Boston.
- Clarke AE, Newbigin E. 1993. Self incompatibility in plants.
- Costa F, Stella S, Van de Weg WE, Guerra W, Cecchinell M, Dallavia J, Koller B, Sansavivini S. 2005. Role of the genes Md-ACO1 and Md-ACS1 in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh). *Euphytica* **141**:181–190.
- Crosby JA, Janick J, Pecknold PC, Korban SS, O'Connor PA, Ries SM, Goffreda J, Voordeckers A. 1992. Breeding Apples for Scab Resistance: 1945 – 1990. *Acta Horticulturae*:43–70.
- Cummins JN, Aldwinckle HS. 1983. Breeding Apple Rootstocks. Pages 294–394 *Plant Breeding Reviews*. Springer US.
- Dayton DF, Mowry JB, Hough LF, Balley CH, Williams EB, Janick J, Emerson FH. 1970. Prima - an early fall red apple with resistance to apple scab. *Fruit Varieties and Horticultural Digest* **24**:20–22.
- Dayton DF, Williams EB. 1970. Additional allelic genes in *Malus* for scab resistance of two reaction types. *J. Am. Soc. Hortic. Sc.* **95**:735–736.
- Duan N et al. 2017. Genome re-sequencing reveals the history of apple and supports a two-stage model for fruit enlargement. *Nature Communications* **8**. Nature Publishing Group.
- Dvořák A. 1987. Pěstování jabloní. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
- Dvořák A, Vondráček J, Kohout K, Blažek J. 1976. Jablka. Academia, Praha.
- Ellegren H. 2004, June. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution.
- Flachowsky H, Höfer M, Peil A, Schuster M. 2017. Pillnitzer Obstsorten & Obstunterlagen. Dresden.
- Freeland J. 2005. Molecular Ecology. Page Molecular Ecology. Elsevier Inc.
- Freeland J, Kirk H, Petersen S. 2011. Molecular Ecology. John Wiley & Sons, Ltd.
- Goldstein D, Schlotterer C. 1999. Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford University Press, Oxford.

- Hancock JM. 1995. The Contribution of Slippage-Like Processes to Genome Evolution. *Journal of Molecular Evolution*:1038–1047.
- Hruban V. 1999. Principy a aplikace molekulární genetiky ve šlechtění. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
- Hsieh LS, Moos M, Lin Y. 1995. Characterization of apple 18 and 31 kd allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **96**:960–970.
- Kende H. 1993. Ethylene biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**:283–307.
- Kolář J. 2019. Nové technologie urychlují šlechtění jabloně. Available from <http://www.ueb.cas.cz/cs/content/nove-technologie-urychluji-slechteni-jablone>.
- Laurens F, Pitiot C. 2003. French apple breeding program: A new partnership between Inra and the nurserymen of Novadi. *Acta Horticulturae* **622**:575–582.
- Markussen T, Kruger J, Schmidt H, Dunemann F. 1995. Identification of PCR-based markers linked to the powdery mildew resistance gene Pl1 from *Malus robusta* in cultivated apple. *Plant Breeding* **114**:530–534.
- Melounová M, Vejl P, Sedlák P, Blažek J, Zoufalá J, Milec Z, Blažková H. 2005. Alleles controlling apple skin colour and incompatibility in new Czech apple varieties with different degrees of resistance against *Venturia inaequalis* CKE. *Plant, Soil and Environment* **51**:65–73.
- Merwin IA, Brown, S. K. Rosenberger, D. A. Cooley DR, Berkett LP. 1994. Scab-resistant apples for the northeastern United States : new prospects and old problems. *Plant disease* **78**:4–10.
- Odenbach W, Sacristan MD. 1997. *Biologische Grundlagen der Pflanzen-Züchtung*. Pery Buchverlag, Berlin.
- Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites.
- Pagliarani G, Paris R, Arens P, Tartarini S, Ricci G, Smulders MJM, van de Weg WE. 2013. A qRT-PCR assay for the expression of all Mal d 1 isoallergen genes. *BMC Plant Biology* **13**:51.
- Patocchi A et al. 2020. Ten years of Vinqest: first insight for breeding new apple cultivars with durable apple scab resistance. *Plant Disease*:PDIS-11-19-2473-SR.
- Rod J. 1982. Šlechtění rostlin. Státní zemědělské nakladatelství Praha, Praha.
- Schmittgen TD, Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* **3**:1101–1108.
- Snustad P, Simmons M. 2012. *Principles of Genetics*. 6th. John Wiley & Sons, Ltd.
- Sunako T, Sakuraba W, Senda M, Akada S, Ishikawa R, Niizeki M, Harada T. 1999. An Allele of the Ripening-Specific 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Synthase Gene ( ACS1 ) in Apple Fruit with a Long Storage Life. *Plant Physiology* **119**:1297–1304. American Society of Plant Biologists (ASPB).
- Tanksley, S. D. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant. Mol. Biology Reporter* **1**:3–8.
- Tartarini S, Gianfranceschi L, Sansavini S, Gessler C. 1999. Development of reliable PCR markers for the selection of the Vf gene conferring scab resistance in apple. *Plant Breeding* **118**:183–186.
- Tian YK, Wang CH, Zhang JS, James C, Dai HY. 2005. Mapping Co, a gene controlling the columnar phenotype of apple, with molecular markers. *Euphytica* **145**:181–188.
- Turechek WW, Carroll JE, Rosenberger DA. 2004. Powdery Mildew of Apple. Disease Identification Sheet No. 102GFSTF-D4. Integrated Pest Management.
- Udvardi MK, Czechowski T, Scheible WR. 2008. Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. *The Plant Cell* **20**:1736–1737.

- USDA. 2019. Fresh Apples, Grapes, and Pears: World Markets and Trade. Available from <https://public.govdelivery.com>.
- Vávra R, Žďárská I, Kadlecová V, Blažek J, Vejl P, Sedlák P, Melounová M. 2015. Selekce jabloní v rané vývojové fázi s využitím molekulárních markerů. Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o., Holovousy.
- Vejl P. 1997. Polymerázová řetězová reakce. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
- Vejl P, Melounová M, Sedlák P, Zoufalá J, Blažková H, Milec Z, Blažek J, Vávra R, Křelinová J. 2005. Molekulární markery ve šlechtění jabloní první vydání. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
- Vejl P, S. S, Sedlák P, Bardová M. 2002. Analýzy rostlinného genomu. Česká zemědělská univerzita v Praze. PowerPrint, Praha.
- Vejl P, Skupinová S, Blažek J, Sedlák P, Bardová M, Blažková H, Milec Z, Drahošová H, Blažková H, Milec Z. 2003. PCR Markers of Apple Resistance to Scab (*Venturia inaequalis* CKE.) Controlled by Vf Gene in Czech Apple Breeding. *Plant, Soil and Environment* **49**:427–432.
- Zoufalá J, Vejl P, Melounová M, Blažek J, Křelinová J. 2009. Apple genetics resources and their molecular analysis. *Page Agriculture (Poľnohospodárstvo)*.

## 6 Seznam použitých zkratek a symbolů

ACC	1-aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinu
ACO	ACC-oxydáza
ACS	ACC-syntáza
AFLP	Délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů
cDNA	Komplementární DNA
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ENA	2'-O,4'-C-ethylene nucleic acid
EU	Evropská Unie
MAS	Marker Assisted Selection
mRNA	Messengerová RNA
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PCR-RFLP	Kombinace PCR a RFLP
qRT-PCR	Kvantitativní (real time) polymerázová řetězová reakce
RAPD	Náhodně amplifikovaná polymorfní DNA
RFLP	Polymorfismus délky restrikčních fragmentů
RNA	Ribonukleová kyselina
SAM	S-adenosyl-L-methionin
SCAR	Sequence-characterized Amplified Region (Amplifikovaná oblast charakterizovaná sekvencí)
SMM	Stepwise Mutation Model
SNP	Polymorfismus jednoho nukleotidu
SSR	Simple Sequence Repeats (Opakování krátkého motivu DNA)
STR	Simple Tandem Repeats (Krátké tandemové repetice)
UV-B	Středněvlnné ultrafialové záření (280-315nm)
VNTR	Variable Number Tandem Repeats (Tandemové repetice s variabilním počtem opakování)
VŠUO	Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy

## 7 Seznam tabulek

Tabulka 1: Teorie gen proti genu. Upraveno podle (Vejl et al. 2002) .....	25
Tabulka 2: Třídy reakcí semenáčků během infekčního testu (Vejl et al. 2002) .....	30
Tabulka 3: Zdroje rezistence vůči strupovitosti (Bus et al 2011) .....	30
Tabulka 4: Zdroje polygenní rezistence vůči strupovitosti (Vejl et al. 2005) .....	31
Tabulka 5: - Velikost amplifikovaných fragmentů při použití primerů Barva-a1 a Barva-a2 (Vávra et al. 2015) .....	35
Tabulka 6: Sekvence primeru pro analýzu S-alel. Zdroj (Broothaerts 2002) .....	44

## 8 Seznam obrázků

Obrázek 1: Evoluční mapa jabloní, upraveno podle (Duan et al. 2017) .....	10
Obrázek 2: Fylogenetický strom jabloní (Duan et al. 2017) .....	11
Obrázek 3: Nejpěstovanější odrůdy jablek v EU. Upraveno podle (Binard 2018).....	13
Obrázek 4: Elektroforéza mikrosatelitů. Upraveno podle (Freeland 2005) .....	15
Obrázek 5: Princip metody RFLP. Zdroj (Vejl et al. 2002) .....	16
Obrázek 6: PCR (Freeland 2005) .....	16
Obrázek 7: Single Nucleotide Polymorphism. Upraveno podle (Snustad & Simmons 2012) ..	17
Obrázek 8: Diagram srovnání sekvencí DNA (Freeland 2005).....	17
Obrázek 9: Stepwise mutation model. Zpracováno podle (Ellegren 2004).....	18
Obrázek 10: Schéma DNA Slippage. Upraveno podle (Oliveira et al. 2006) .....	19
Obrázek 11: PCR Denaturace dsDNA. Upraveno podle (Brown 2010).....	20
Obrázek 12: PCR Annealing. Upraveno podle (Brown 2010) .....	21
Obrázek 13: PCR Elongace. Upraveno podle (Brown 2010) .....	21
Obrázek 14: Gelová elektroforéza. Upraveno podle (Brown 2010) .....	22
Obrázek 15: Biotické a abiotické faktory. Upraveno podle (Odenbach & Sacristan 1997).....	23
Obrázek 16 : Plody napadené strupovitostí. (Agrios 2004) .....	25
Obrázek 17: <i>Venturia inaequalis</i> , Ascospory pod mikroskopem (Agrios 2004). .....	26
Obrázek 18: Životní cyklus <i>Venturia inaequalis</i> . Upraveno podle (Agrios 2004) .....	27
Obrázek 19: PCR AL07 a AM19 (Tartarini et al. 1999) .....	28
Obrázek 20: Rodokmen odrůdy Prima. Zdroj (Dayton et al. 1970) .....	30
Obrázek 21: Příznaky padlí na rostlině. Vlastní foto.....	32
Obrázek 22: Příznaky padlí na ovoci. (Agrios 2004) .....	32
Obrázek 23: životní cyklus <i>P. Leucotricha</i> . Upraveno podle Vejl et al. (2002) .....	33
Obrázek 24: Vzorový elektroforeogram markeru BC266-STS (Barva-a1) (Vávra et al. 2015) ..	35
Obrázek 25: Vzorový elektroforeogram markeru BC266-STS (Barva-a2) (Vávra et al. 2015) ..	36
Obrázek 26: Vzorový elektroforeogram kodominantního markeru <i>MdMYBA</i> (Vávra et al. 2015) .....	36
Obrázek 27: Elektroforeogram dom. markeru <i>MdMYB10</i> . Upraveno podle Vávra et al. (2015) .....	37
Obrázek 28: Vzorový elektroforeogram <i>Md-ASC1-CZU</i> . Zdroj (Vávra et al. 2015) .....	38
Obrázek 29: Vzorový elektroforeogram kodominantního markeru <i>Md-ACO1-CZU</i> . Zdroj (Vávra et al. 2015) .....	39
Obrázek 30: Vzorový chromatogram markeru CH03d11. Zdroj (Vávra et al. 2015) .....	41
Obrázek 31: Gametofytická inkompatibilita. Zdroj (Clarke & Newbiggin 1993) .....	42
Obrázek 32: Sporofytická inkompatibilita. Zdroj Clarke & Newbiggin (1993) .....	43
Obrázek 33: Vzorový elektroforeogram. Zdroj (Broothaerts 2002) .....	44
Obrázek 34: Odrůda PiCol1 se sloupovitým růstem, rezistencí proti padlí, citlivá vůči strupovitosti. (Flachowsky et al. 2017).....	45
Obrázek 35: Odrůda PiRo1, první vyšlechtěná odrůda s červenou dužninou (Flachowsky et al. 2017).....	45
Obrázek 36: Odrůda PiRo1 (Flachowsky et al. 2017).....	46
Obrázek 37: Šlechtění odrůdy Bonita (Kolář 2019) .....	47
Obrázek 38: Rosabel. Zroj (www.vsuo.cz) .....	48